

TECNOLÓGICO DE COSTA RICA

ESCUELA DE QUÍMICA

CARRERA DE INGENIERÍA AMBIENTAL

Proyecto Final de Graduación para optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería  
Ambiental

**“Saneamiento tipo Terra Preta de biosólidos obtenidos a partir de sanitarios  
ecológicos secos”**

Stephanie Estrella Ubau Piedra

CARTAGO, MARZO, 2019

**TEC** | Tecnológico  
de Costa Rica

**ingeniería**  
ambiental



**“Saneamiento tipo Terra Preta de biosólidos obtenidos a partir de sanitarios  
ecológicos secos”**

Informe presentado a la Escuela de Química del Instituto Tecnológico de Costa Rica  
como requisito parcial para optar por el título de Ingeniero Ambiental con el grado de  
licenciatura

**Miembros del tribunal**



**Dra. Andrea Quesada González.**  
**Directora**



**PhD. Federico Masis Meléndez**  
**Lector 1**



**M Sc. Jorge Alberto Calvo Gutiérrez**  
**Lector 2**



**M Sc. Diana A. Zambrano P.**  
**Coordinador COTRAFIG**



**MGA. Ricardo Coy Herrera**  
**Director Escuela de Química**

**M Sc. Ana Lorena Arias Zúñiga**  
**Coordinadora Carrera de Ingeniería Ambiental**

## DEDICATORIA

### *A Dios*

Por regalarme cada día de mi vida, por cada momento en que me permite trabajar con todas mis fuerzas para alcanzar mis metas y por las personas que me ha permitido conocer y las enseñanzas que me transmitieron y transmiten.

### *A mi familia*

El mayor regalo que me ha dado la vida, llenos de paciencia y sabias palabras. Mi padre y mi madre, por enseñarme con su ejemplo que podemos llegar a ser lo que nos propongamos tras luchar arduamente por ello y que siempre hay una forma ingeniosa para hacer las cosas. A mis abuelos, por mostrarme que con amor cualquier acción marca una gran diferencia, que nunca es tarde para cambiar de vida y que podemos llegar a ser buenos en cualquier tarea tras intentarlo. A mis tíos y tías, incansables en sus hogares y en sus empleos, ejemplos a seguir de superación personal. A mis primos, con vidas llenas de posibilidades, inspiración para trabajar cada día.

### *A mis amigos*

Luchadores ejemplares en sus áreas, incansables estudiantes y trabajadores, llenos de alegrías y sueños. Apoyo incondicional e irremplazable.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi tutora, la Dra. Andrea Quesada Gonzáles quien me acompañó y mostro el camino durante todo este proceso, a quien no tengo palabras o forma suficiente para agradecer.

Al profesor PhD Federico Masís Meléndez guía constante durante este proceso y ejemplo de pasión por el trabajo.

A mis profesores, guías durante el aprendizaje académico, llenos de conocimiento y energía para transmitirlo lo mejor posible.

Al personal del Centro de Investigación y de Servicios Químicos y Microbiológicos (CEQIATEC), pacientes instructores en esta etapa.

A Marco, por estar siempre dispuesto a ayudarme, incluso más allá de lo esperado. A la Ing. María Fernanda Jiménez por todo el tiempo de ayuda. A los profesores Erick Romero Blanco y Jorge Calvo Gutiérrez quienes estuvieron dispuestos a ayudarme durante toda mi educación sin importar el día de la semana o la hora.

## CONTENIDO

RESUMEN .....	1
ABSTRACT .....	2
1 INTRODUCCIÓN .....	3
2 OBJETIVOS .....	5
2.1 Objetivo general .....	5
2.2 Objetivos específicos .....	5
3 REVISIÓN DE LITERATURA .....	6
3.1 Recurso hídrico y saneamiento .....	6
3.2 Sistema de saneamiento Terra Preta .....	14
4 METODOLOGÍA .....	22
4.1 Caracterización del biosólido de sanitarios ecológicos secos .....	22
4.1.1 Caracterización físico-química del sustrato .....	22
4.1.2 Caracterización biológica del biosólido inicial .....	25
4.2 Optimización de la fermentación ácido-láctica .....	28
4.3 Optimización del vermicompostaje .....	30
4.4 Aplicación del mejorador de suelo .....	31
4.5 Análisis estadístico .....	32
4.6 Evaluación de aspectos económicos .....	33
5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	34
5.1 Caracterización del biosólido de sanitarios ecológicos secos .....	34
5.1.1 Caracterización fisicoquímica .....	34
5.1.2 Caracterización biológica .....	35
5.2 Optimización de la fermentación ácido láctica .....	37

5.3 Optimización del vermicompostaje.....	42
5.4 Aplicación del mejorador de suelo.....	43
5.5 Evaluación de aspectos económicos .....	49
6 CONCLUSIONES .....	53
7 RECOMENDACIONES.....	55
8 REFERENCIAS.....	56
Apéndice 1 .....	66
Apéndice 2.....	67
Apéndice 3 .....	68

## LISTA DE SIGLAS Y ACRÓNIMOS

ASADAS: Asociaciones Administradoras de los Sistemas de Acueductos y Alcantarillados Comunes.

ATCC: American Type Culture Collection.

AyA: Instituto Costarricense de Acueductos y Alcantarillados.

BF: Biosólido fermentado.

BI: Biosólido inicial proveniente de SES.

BV: Biosólido vermicompostado.

CIA: Centro de Investigaciones Agronómicas, UCR.

ESPH: Empresa de Servicios Públicos de Heredia.

FAL: Fermentación Ácido Láctica.

MINAE: Ministerio del Ambiente y Energía.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

ONU: Organización de las Naciones Unidas.

PTAR: Planta de Tratamiento de Aguas Residuales.

SES: Sanitarios Ecológicos Secos.

TP: Terra Preta.

TPS: Saneamiento Terra Preta.

UCR: Universidad de Costa Rica.

UNICEF: Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia.



## LISTA DE SIMBOLOS

%: Porcentaje

B: Boro

°C: Grados Centígrados

C: Carbono

Ca: Calcio

Cu: Cobre

Fe: Hierro

g: Gramos

H: Hidrógeno

h: Horas

K: Potasio

kg: Kilogramos

L: Litros

m: Metro

Mg: Magnesio

mg: Miligramos

min: Minutos

ml: Mililitro

Mn: Manganeseo

N: Nitrógeno

OH: Hidróxido

P: Fósforo

pH: Medida de acidez

S: Azufre

UFC: Unidades formadoras de colonia

Zn: Zinc

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 3.1.</b> Gráfico de cobertura de abastecimiento por ente operador.....	6
<b>Figura 3.2.</b> Gráfico de cobertura de los sistemas de saneamiento en Costa Rica.....	8
<b>Figura 3.3.</b> Esquema de los SES sin separación (izquierda) y con separación (derecha). ..	13
<b>Figura 3.4.</b> Sanitarios ecológicos secos ubicados en Malawi.....	15
<b>Figura 4.1.</b> Diagrama metodológico para la caracterización físico-química del biosólido inicial. ....	24
<b>Figura 4.2.</b> Diagrama metodológico para la identificación de insectos y los recuentos de bacterias, hongos, levaduras, coliformes y enterobacterias, para el biosólido inicial proveniente de sanitarios ecológicos secos. ....	26
<b>Figura 4.3.</b> Diagrama metodológico para la identificación cualitativa bacteria patógenas.	28
<b>Figura 4.4.</b> Diagrama metodológico para la optimización de la fermentación ácido láctica .....	30
<b>Figura 4.5.</b> Diagrama metodológico para la optimización del vermicompostaje.....	31
<b>Figura 4.6.</b> Diagrama de la metodología para evaluar el efecto del biosólido similar de la Terra Preta en el desarrollo de plántulas. ....	32
<b>Figura 5.1.</b> Sanitario ecológico seco, ubicado en la Zona de los Santos, San José .....	34
<b>Figura 5.2.</b> Pseudo-escorpión y cochinilla encontradas en el sustrato sólido de Sanitarios Ecológicos Secos previo a los tratamientos.....	36
<b>Figura 5.3.</b> Variación del pH promedio presentado en el vermicompostaje con distintos sustratos. ....	43
<b>Figura 5.4.</b> Plántulas luego del trasplante (0 d). ....	44
<b>Figura 5.5.</b> Gráfica de intervalos de longitud de hoja con un 95% de confianza. ....	45
<b>Figura 5.6.</b> Gráfica de intervalos para el número de hojas con un 95% de confianza. ....	46
<b>Figura 5.7.</b> Gráfica de intervalos para peso seco (g) con un 95% de confianza.....	47
<b>Figura 5.8.</b> Desarrollo por parte de las lechugas tras 19 d desde el trasplante.....	48

<b>Figura 5.9.</b> Tratamiento con mejorador de suelo producido, abono orgánico comercial y suelo (de Izq. a derecha) tras 4 semanas desde el trasplante. ....	48
--	----

## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro 3.1.</b> Resumen de las características utilizadas para diferenciar tres clases ecológicas de lombrices de tierra. ....	19
<b>Cuadro 4.1.</b> Especificaciones para el recuento de microorganismos .....	25
<b>Cuadro 4.2.</b> Medios de enriquecimiento y cultivo para la aislación de <i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i> y <i>E. coli</i> O157 H:7 .....	27
<b>Cuadro 5.1.</b> Elementos presentes en el sustrato de Sanitarios Ecológicos Secos previo a los tratamientos, las mediciones fueron realizadas por el Centro de Investigaciones Agronómicas de la Universidad de Costa Rica.....	35
<b>Cuadro 5.2.</b> Valores de pH en las FAL realizadas en dos medios de cultivo y dos distintas BAL .....	38
<b>Cuadro 5.3.</b> Valor del pH tras la fermentación ácido láctica con presencia de oxígeno. ....	40
<b>Cuadro 5.4.</b> Valor de pH final después del tratamiento de la fermentación ácido láctica ..	41
<b>Cuadro 5.5.</b> Insumos utilizados por el sistema de saneamiento Terra Preta para el tratamiento de 80 L de biosólido inicial producido en un sanitario ecológico seco.....	50
<b>Cuadro 5.6.</b> Proyección de costos de los primeros dos años de saneamiento. ....	51
<b>Cuadro 5.7.</b> Proyección del costo unitario del cultivo de lechugas.....	52

## RESUMEN

En Costa Rica el 75% de las fuentes de abastecimiento de agua potable se encuentran amenazadas por contaminación de nitratos y aguas residuales mayoritariamente procedente de los agroquímicos de la agricultura y de tanques sépticos respectivamente. El uso de sanitarios ecológicos secos incide en ambos temas, al eliminar el uso de agua para el arrastre de excretas lo que suprime la necesidad de tanques sépticos y provee biosólidos que al ser tratados de forma correcta suministran un mejorador de suelo el cual puede sustituir los agroquímicos. El tratamiento de saneamiento Terra Preta (TPS), cuya finalidad es obtener un sustrato similar al suelo negro del Amazonas es un tratamiento adecuado para los biosólidos. En el presente trabajo se realizó el saneamiento de biosólidos provenientes de un sanitario ecológico seco de la zona de los Santos. El sistema compuesto por una fermentación ácido láctica (FAL) y un vermicompostaje, produce una mejora en las características físicas y químicas; así como una inhibición de patógenos en el biosólido tratado. El biosólido inicial con una relación C/N de 12,53, un pH de 6,7 y pF de 4,15 con presencia de *Salmonella*, al cual se le aplicó TPS obteniéndose un mejorador de suelo libre de patógenos de pH 6,52 y relación C/N de 12,25. Este fue aplicado como mejorador de suelo en lechuga en concentraciones del 4,4% v/v provocando un crecimiento casi 4 veces mayores de peso seco a las plantas que no fueron sometidas a la aplicación del sustrato y 1,5 veces mayor de peso seco a las plantas tratadas con un abono comercial tras 3 semanas de crecimiento.

**Palabras clave:** Terrapreta, fermentación ácido láctica, vermicompostaje, servicios ecológicos secos, lechugas.

## ABSTRACT

In Costa Rica, 75% of the sources of drinking water supply are threatened by nitrate and wastewater contamination, mainly from agricultural agrochemicals and septic tanks, respectively. The use of dry ecological toilets affects both issues, by eliminating the use of water to carry away excreta, which eliminates the need for septic tanks and provides biosolids that, when treated correctly, provide a soil improver which can substitute agrochemicals. The treatment of sanitation Terra Preta (TPS), whose purpose is to obtain a substrate like the black soil of the Amazon is an adequate treatment for biosolids. In the present work, the sanitation of biosolids from a dry ecological sanitation in the Santos area was carried out. The system composed of a lactic acid fermentation (FAL) and a vermicomposting, produces an improvement in the physical and chemical characteristics; as well as an inhibition of pathogens in the treated biosolid. The initial biosolid with a C / N ratio of 12.53, a pH of 6.7 and pF of 4.15 with the presence of Salmonella, to which TPS was applied, obtaining a soil improver of pathogens free of pH 6.52 and C / N ratio of 12.25. This was applied as a soil improver in lettuce in concentrations of 4,4% v / v causing almost 4 times greater growth of dry weight to the plants that were not subjected to the application of the substrate and 1.5 times greater of dry weight to the plants. plants treated with a commercial fertilizer after 3 weeks of growth.

**Keywords:** Terra Preta, lactic acid fermentation, vermicomposting, dry ecological services, lettuce.

## 1 INTRODUCCIÓN

El tratamiento de las aguas residuales ha cambiado y evolucionando a lo largo de la historia ligado al crecimiento poblacional, provocando una búsqueda de nuevos recursos para ayudar a mantener el equilibrio entre la oferta y la demanda (Salgot y Folch, 2018). En Costa Rica, gran parte de las aguas residuales son vertidas a los ríos y mares con deficiente o nulo tratamiento, como consecuencia de esto y la necesidad de cumplir el compromiso con los Objetivos de Desarrollo Sostenible, incluidos en la Agenda 2030, aprobada por los Estados miembros de la Organización de las Naciones Unidas (ONU), es necesario entre otros propósitos lograr el acceso a servicios de saneamiento e higiene adecuados y equitativos para todos (AyA, MINAE y Ministerio de Salud, 2016).

Los sanitarios convencionales representados por los inodoros con descarga de agua y las aguas residuales, cuenta con una gran cantidad de desventajas debido a los tratamientos, la complejidad de los equipos y la necesidad de experiencia para el manejo del tratamiento, además del consumo elevado de energía y las emisiones que producen (Hu, Bin, Hongliang, Bo y Shikun, 2016). Los sanitarios ecológicos secos (SES) son una alternativa de saneamiento sustentable, basado en el aprovechamiento, cerrando el ciclo de flujo de materiales y generando una reconceptualización de saneamiento, pasando de tirar-desaguar-olvidar a un tirar y reusar (Hu *et al.*, 2016). Una opción para tratar los biosólidos producidos en los SES es el saneamiento Terra Preta.

El Saneamiento Terra Preta (TPS, por sus siglas en inglés) inspirado en el descubrimiento de un suelo negro en el Amazonas, con altos contenidos de carbón orgánico pese al abandono del mismo hace cientos de años por los antiguos Amazonas, cuyo rendimiento en los cultivos es tres veces mayor (Factura *et al.*, 2014) frente al del suelo adyacente. TPS combina los procesos biológicos fermentación ácido láctica (FAL) y vermicompostaje para transformar excretas humanas en un humus rico en nutrientes y materia orgánica (Yemaneh, Bulbo, Schmale, y Otterpohl, 2014) convirtiéndolos en abonos orgánicos, cuya utilización permite combatir los desafíos actuales de la agricultura, como el

cambio climático, la degradación y pérdida de fertilidad de los suelos y la alta demanda de alimentos.

Hasta ahora se ha conseguido aumentar el rendimiento de los cultivos principalmente mediante prácticas poco sostenibles a largo plazo, tales como el manejo abusivo del suelo y el uso excesivo de fertilizantes, a expensas de la reducción de la calidad del suelo y del aumento de contaminación. Esto hace necesario implementar en el sector agrícola estrategias sostenibles que aumenten el rendimiento de los cultivos sin aumentar el impacto (Olmo Prieto, 2016). Un ejemplo de estas estrategias es la agricultura orgánica, definido como los sistemas agrícolas que promueven la producción ecológica, social y económica sana de alimentos. Este tipo de agricultura utiliza bioabonos (similares al producido por TPS) producto de transformaciones biológicas y químicas, utilizado como fuente de nutrimento y mejorador de suelos (Asamblea Legislativa de Costa Rica, 2001). Es necesario comprobar que el sistema de saneamiento sea efectivo para la desinfección del biosólido y el mejoramiento de las características físico-químicas. El principal objetivo de este trabajo es producir un mejorador de suelo inocuo a partir de biosólidos de SES por medio del sistema TPS; además, de examinar el efecto de su uso como mejorador de suelo.



## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 *Objetivo general***

Producir un mejorador de suelo inocuo a partir de biosólido de sanitarios ecológicos seco por medio del sistema de saneamiento Terra Preta.

### **2.2 *Objetivos específicos***

Caracterizar biológica y físico-químicamente (humedad, nitrógeno, carbono y pH) el biosólido proveniente de SES y el producto final obtenido después de los tratamiento.

Optimizar la fermentación ácido láctica bajo condiciones controladas garantizando la descontaminación de patógenos.

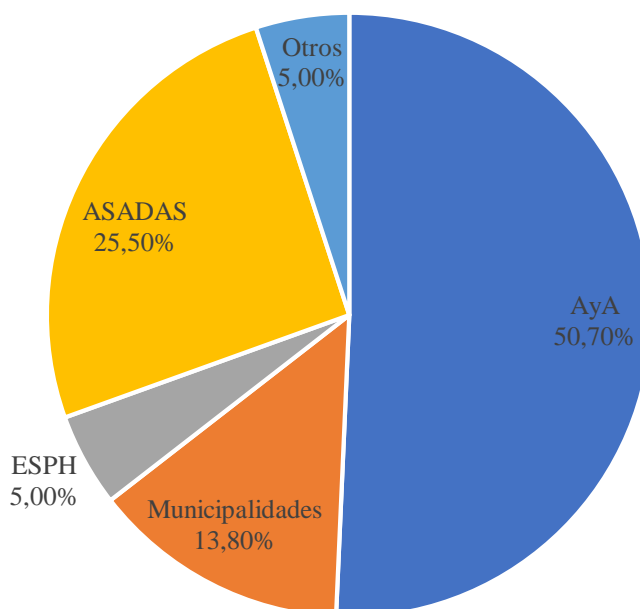
Mejorar las condiciones físicas y químicas del biosólido fermentado empleando el vermicompostaje como segunda etapa del sistema de saneamiento.

Evaluar la eficiencia del precursor de Terra Preta *in vivo* mediante su aplicación en el cultivo de lechugas en invernadero.

### 3 REVISIÓN DE LITERATURA

#### 3.1 Recurso hídrico y saneamiento

Según el Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia y la Organización Mundial de la Salud (UNICEF y OMS, 2017), en el reporte Progress on Drinking Water, Sanitation and Hygiene, 29% de la población mundial (2,1 billones de personas) utilizan y consumen agua sin un manejo adecuado y seguro para su potabilización. En el caso de Costa Rica el 99,5% de la población recibe agua por tubería; sin embargo, solo el 91,8 % recibe agua de calidad potable y únicamente el 74,1% del agua que recibe la población es sometida a un control de calidad (*Programa Estado de la Nación*, 2017). Como se observa en la figura 3.1, el Instituto Costarricense de Acueductos y Alcantarillados (AyA) suministra agua al 50,7% de la población, mientras que las Asociaciones Administradoras de los Sistemas de Acueductos y Alcantarillados Comunes (ASADAS) al 25,5%, siendo los dos entes más importantes que velan por el suministro del agua potable en el país.



**Figura 3.1.** Gráfico de cobertura de abastecimiento por ente operador

Fuente: (Instituto Costarricense de Acueductos y Alcantarillados, 2016)

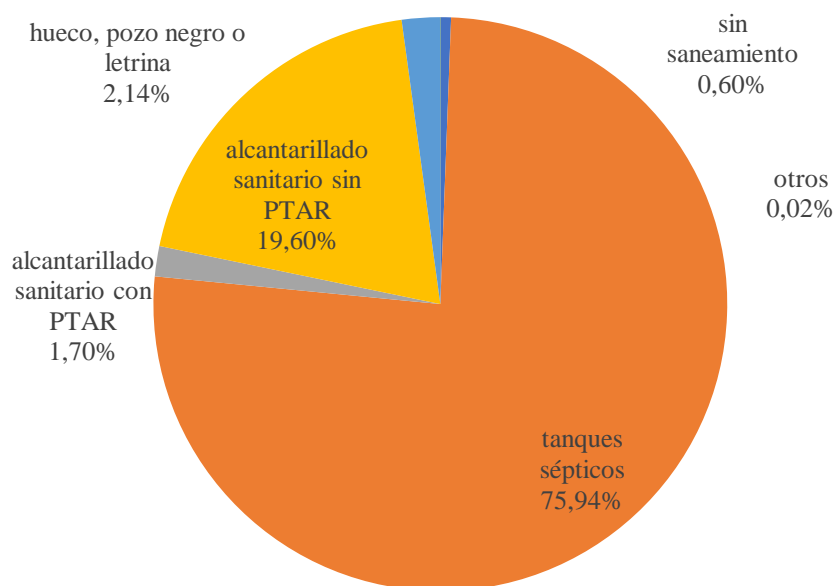
Por otro lado, el AyA y la Empresa de Servicios Públicos de Heredia (ESPH) suministran agua con un 99% de potabilidad, mientras que para ASADAS el indicador es de solo el 78,1% (*Programa Estado de la Nación*, 2017). Según Valverde (2013) de los acuíferos se obtiene el 60% del agua para consumo humano y el 36% de la necesaria para la industria. De forma general, el consumo diario de agua se estima en un mínimo de 200 L por persona, distribuyéndose el uso aproximadamente en: 30% para la ducha, 30% en el servicio sanitario convencional, 30% en el lavamanos y 10 % en las labores domésticas como preparación de alimentos, riego de plantas, lavado de ropa y limpieza en general (Herrera Cervantes, 2011).

Por lo tanto, bajo un consumo promedio de 60 L de agua en las descargas diarias del inodoro, se estima que anualmente se utilizan 21 900 L de agua potable per cápita para el arrastre de las excretas y la orina. De modo que los 5 millones de habitantes, que se estimó llegaría a tener el país para el año 2018 (Bermúdez, 2015) anualmente utilizarían 109,5 millones de m<sup>3</sup> de agua, únicamente para el arrastre de excretas y la orina del inodoro a un sistema de saneamiento. El agua residual contiene un número considerable de recursos valiosos, como nutrientes y materia orgánica; sin embargo, también contiene patógenos, fármacos, hormonas y pesticidas. En los sistemas centralizados de recolección según Andreev *et al.* (2018) el transporte facilita el tratamiento centralizado; sin embargo, los contaminantes solo son parcialmente removidos; además se mezclan las aguas residuales de la industria con las aguas pluviales y las domésticas.

En conclusión, es necesario realizar un saneamiento de estas aguas, con el fin de reutilizarlas o disponerlas de forma segura. Entendiéndose por saneamiento instalaciones y servicios que permiten eliminar sin riesgo la orina y las heces (Organización Mundial de la Salud, 2019); así mismo, las aguas que se utilizaron para el arrastre de estas. A nivel mundial el 39% de la población no cuenta con un sistema de saneamiento adecuado (UNICEF y OMS, 2017), constituyendo una causa importante de morbilidad en todo el mundo (Organización Mundial de la Salud, 2019). Un saneamiento deficiente se encuentra asociado a la transmisión de enfermedades como el cólera, la diarrea, la disentería, la hepatitis A, la fiebre tifoidea y la poliomielitis (OMS, 2017). Anualmente mueren alrededor del mundo 2 millones

de personas a causa de enfermedades diarreicas, la mayoría niños menores de 5 años (Factura *et al.*, 2014).

En Costa Rica los sistemas de saneamiento incluyen tanques sépticos y plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR) en la figura 3.2. se observa la cobertura porcentual que presenta cada sistema. Siendo los dos sistemas de saneamiento más utilizados los tanques sépticos, empleados por el 75,94% de la población y alcantarillado sin planta de tratamiento de aguas residuales, utilizado por el 19,60% de los costarricenses. La utilización de estos sistemas acarrea una serie de problemas; por ejemplo, la contaminación directa a cuerpos receptores por la descarga continua de material fecal. Según el Informe Estado de la Nación (2017) la alta dependencia de tanques sépticos genera problemas adicionales ya que su funcionamiento se ve afectado por factores como el tipo de suelo, clima, características del agua a tratar y su volumen.



**Figura 3.2.** Gráfico de cobertura de los sistemas de saneamiento en Costa Rica

Adaptado de: (AyA, Dirección de Agua del MINAE y Fondo Regional del Caribe para la Gestión de las Aguas Residuales, 2016)

Asociado a estos factores, Costa Rica presenta un suelo con alta permeabilidad lo que aumenta la tasa de infiltración y con esto el foco de contaminación en acuíferos debido a la infiltración de aguas con arrastre de contaminantes (Herrera Murillo, 2017). Generando amenaza el 75% de las fuentes de abastecimiento de agua para consumo humano por contaminación de aguas residuales provenientes de tanques sépticos (Valverde, 2013). Por otra parte, las plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR) que se encuentran en el país necesitan una gran inversión, un ejemplo de esto es la PTAR del Roble de Puntarenas, en la que fue necesaria una inversión de 650 millones de colones tras la cual se incrementó la capacidad de tratamiento de carga orgánica. Además, las PTAR se encuentran sujetas a problemas como el presentado por las plantas lagunares del AyA, entre los años 2010 y 2015, donde estas no cumplieron con lo estipulado en el Decreto 33601-MINAE-S, Reglamento de Vertido (Angulo Zamora, 2015).

No obstante, los problemas presentados por el agua residual y los sistemas de saneamiento empleados, se deben a que se consideran un residuo. Según De Gisi, Petta y Wendland (2014), el concepto moderno de que las excretas humanas son un residuo sin un aprovechamiento posible generó los sistemas de saneamiento conocido como a final de tubo (tanque sépticos y PTAR); sin embargo, estos no son naturalmente un desecho sino parte del ciclo natural, en consecuencia, estos autores proponen la reutilización de los biosólidos en la agricultura. Los biosólidos son principalmente materia orgánica producidos durante el tratamiento de aguas residuales, los cuales pueden ser utilizados en diversos fines beneficiosos (United States Environmental Agency, 2000).

Un ejemplo de tales usos es la incorporación de biosólidos al terreno para abastecerlo de nutrientes y para renovar la materia orgánica del terreno. Los biosólidos se pueden utilizar en terrenos agrícolas, bosques, campos de pastoreo o en terrenos alterados que necesitan recuperación (United States Environmental Agency (EPA), 2000). Según la EPA (2000) los biosólidos presentan una ventaja frente a los abonos inorgánicos, debido a que los primeros pueden ser incorporados lentamente por las plantas en crecimiento, ya que son menos solubles en agua y por lo tanto tiene una probabilidad menor de lixiviarse al agua subterránea o ser arrastrados por el agua superficial, estos no reemplazan totalmente los nutrientes del

suelo, por lo que se produce una lenta degradación y pérdida de fertilidad lo cual representa un riesgo para la seguridad alimentaria mundial.

No obstante, la utilización de biosólidos en la agricultura únicamente es una práctica segura con un tratamiento previo que garantice la inhibición de patógenos y condiciones físico-químicas del sustrato que permitan cumplir la función de mejorador de suelo. Sin la ejecución correcta de un tratamiento adecuado, es posible generar problemas ambientales como contaminación a suelo o fuentes de agua, o bien contaminar los cultivos, derivando en problemas a la salud pública. Es decir, la aplicación de materia fecal o la orina pueden resultar beneficiosa para la agricultura, sin embargo, deben realizarse tratamientos que garanticen la seguridad de los sustratos añadidos (United States Environmental Agency (EPA), 2000).

El aprovechamiento de las heces se dificulta debido a la imposibilidad de generalizar los patógenos que se encontrarán en ellas o su concentración; sin embargo, el Instituto de Tecnologías Sustentables (2016) indica que un ser humano normalmente expulsa entre  $10^{11}$  y  $10^{13}$  microorganismos/g de excretas, entre estos, virus de la Hepatitis A y E, adenovirus, rotavirus y poli virus, protozoarios como *Cryptosporidium parvum*, *L. intestinali*, helmintos como *Ascaris lumbricoides*, *Taenia solium/saginata* y *Trichuris trichiura* o bien, bacterias como *Aeromonas* spp., *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* spp. y *Shigella* spp. (Instituto de Tecnologías Sustentables, 2016).

Debido a la presencia de estos patógenos, es importante analizar la eficiencia de los tratamientos de saneamiento para garantizar que los sustratos que se obtienen son seguros para su disposición o aprovechamiento tanto para las personas que lo manipulan como aquellas que potencialmente entren en contacto con estos. Con el objetivo de garantizar la seguridad de la manipulación del sustrato, se realizan pruebas microbiológicas para detectar organismos indicadores asociados a material fecal, tales como, coliformes totales (*E.coli*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Yersinia* y otros) y coliformes fecales (*E.coli*, *Klebsiella*) (Rice, Baird, Eaton, y Clesceri, 2012). Adicionalmente, es importante detectar la presencia de otros indicadores como *Shigella*, *Salmonella* y *E. coli* O157:H7.

La familia *Enterobacteriaceae* incluye al grupo de bacterias conocidas como coliformes, coliformes totales y coliformes fecales (*Citrobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Salmonella* y *Shigella*). Los coliformes son bacilos Gram negativos, aerobios y facultativamente anaerobios. Por otro lado, los coliformes fecales se definen como los coliformes capaces de fermentar lactosa a ácido y gas a (44,5-45,4) °C por 24 h. *E. coli* es parte de la flora normal del tracto intestinal de humanos y de una variedad de animales, no obstante, la mayoría de *E. coli* no causa enfermedades gastrointestinales; sin embargo, ciertos grupos pueden causar diarrea potencialmente mortal y secuelas o discapacidades graves (American Public Health Association, 2001).

El serotipo *E. coli* O157: H7 fermenta el sorbitol en 24 h y no expresan la enzima  $\beta$ -glucuronidasa a diferencia del resto del *E. coli*, siendo el serotipo predominante implicado en brotes en todo el mundo, experimentalmente se ha demostrado que el patógeno sobrevive durante varias semanas o meses en una variedad de alimentos ácidos, como la mayonesa, las salchichas, la sidra de manzana y el queso cheddar (American Public Health Association, 2001). El pH de crecimiento óptimo de este patógeno se encuentra entre 6-7, sin embargo crece hasta pH de 4,4 (Motarjemi y Lelieveld, 2014).

La bacteria *Shigella*, miembro de la familia *Enterobacteriaceae*, es casi genéticamente idéntica a *E. coli* y se encuentra estrechamente relacionada a *Salmonella* y *Citrobacter* spp., existen cuatro especies de *Shigella* clasificadas serológicamente, son bacterias Gram negativas y su principal modo de transmisión es por vía fecal-oral, el agua y los alimentos contaminados son vectores importantes para la distribución de las *Shigella* (American Public Health Association, 2001), el pH óptimo de crecimiento se encuentra entre (9,2-9,3) y un pH mínimo de crecimiento entre (4,9-5,0) (Motarjemi y Lelieveld, 2014). La shigelosis es una de las formas más transmisibles de enfermedad diarreica bacteriana, debido parcialmente a la baja dosis infecciosa (10-200) UFC/g, en la fase aguda de la enfermedad, es posible aislar entre  $10^3$  a  $10^9$  UFC/g heces, mientras que en pacientes convalecientes se recuperan de  $10^2$  a  $10^3$  UFC/g, (American Public Health Association, 2001).

El género *Salmonella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* (Organización Mundial de la Salud, 2006), bacilos móviles que de manera característica fermentan glucosa y manosa

sin producir gas, pero no fermentan lactosa ni sacarosa. La mayor parte de las cepas de este género producen  $H_2S$ , aunque existen cepas atípicas. A menudo son patógenas para el ser humano o los animales cuando se ingieren (Brooks, Carroll, Morse, y Mietzner, 2010). *Salmonella* crece de manera óptima entre un pH de 7,0-7,5, pero logran crecer a pH tan bajos como 3,8 (Motarjemi y Lelieveld, 2014).

En conclusión, existen una amplia serie de patógenos posiblemente transmisibles a través de la ruta fecal-oral, la cual se facilita en caso de contaminación cruzada entre agua residual o heces y la manipulación de estas; no obstante, utilizando mecanismos de separación desde el inicio se reduce el volumen de material contaminado, así como la contaminación cruzada entre las heces y la orina. Según el Instituto de Tecnologías Sustentables (2016) la importancia de separar la orina de las excretas reside en la reducción de olores y del volumen a tratar, permitiendo la recolección de la orina para ser usada como fertilizante y facilita el secado de la materia fecal para un manejo más sencillo. Al utilizar sanitarios ecológicos secos, es posible realizar desde el inicio una recolección separada de los materiales, lo que facilita el manejo y elimina el uso de agua para el arrastre de excretas.

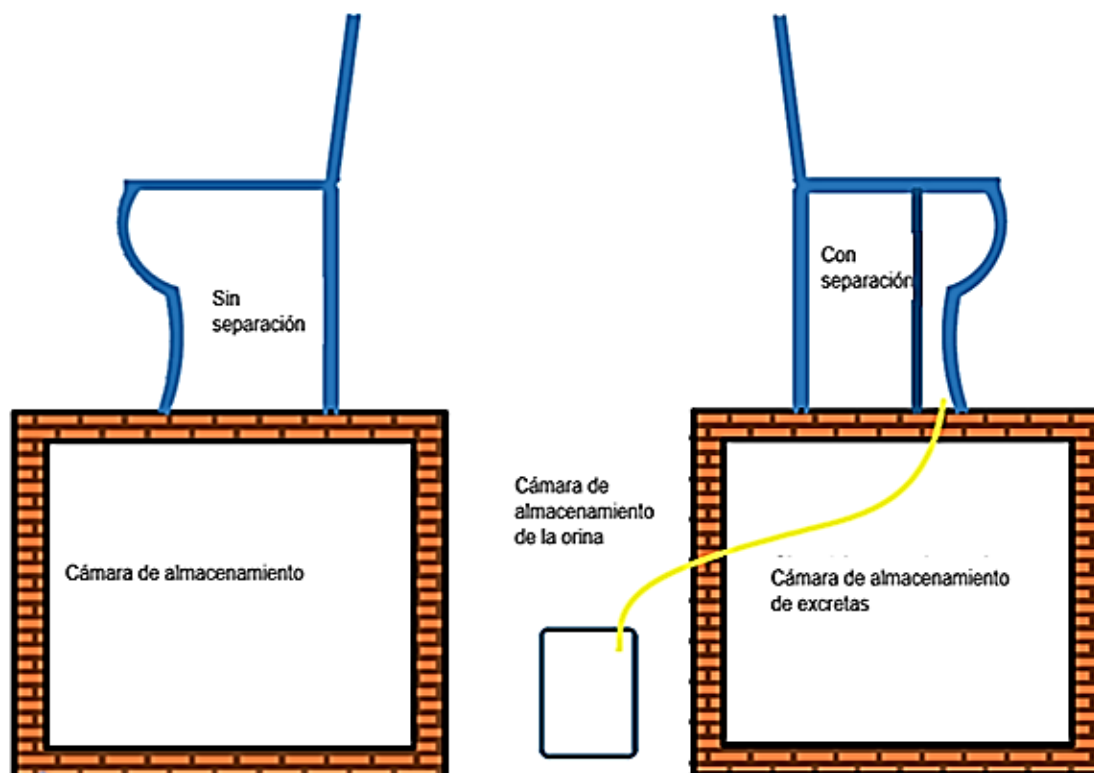
Sanitarios ecológicos secos

Los sanitarios ecológicos secos (SES), no utilizan agua para el arrastre de la orina y el material fecal prescindiendo de la conexión a alcantarillado o tanques sépticos. La clasificación de los SES depende del inodoro, el cual puede contar o no con separación de la orina y las excretas (figura 3.3). La taza no separadora consiste en un inodoro conectado a una cámara donde se da una fermentación aerobia, la cual bajo condiciones adecuadas no presentan malos olores ni plagas (vertebrados, insectos y artrópodos). Por otro lado, los SES con separación consisten en un asiento, diseñado para separar las heces de la orina, la materia fecal cae dentro de una cámara, mientras la orina es dirigida y almacenada (Granados, 2009) para su posterior uso o disposición. Siendo esta opción de SES con separación los más recomendables para evitar olores desagradables y facilitar el tratamiento como se mencionó anteriormente.

En el caso de los SES con separación, es posible aprovechar la orina de manera casi inmediata. Por ejemplo, un estudio realizado en el municipio de El Alto, Bolivia, por



Mamani *et al.* (2015) donde se encuentran instalados SES con tazas separadoras aplicaron a lechugas waldmann green (*Lactuca sativa L.*) orina recolectada cada 2 d, posteriormente se analizaron microbiológicamente y no se detectó la presencia de *Escherichia coli* ni *Salmonella*, indicando una utilización segura como fertilizante. Por otro lado, el material fecal o biosólido, debido a la posible presencia de patógenos, la literatura propone una serie de tratamientos con el fin de asegurar el uso seguro de estos.



**Figura 3.3.** Esquema de los SES sin separación (izquierda) y con separación (derecha).

Entre los tratamientos que se le pueden dar a los biosólidos de los SES se encuentra la deshidratación fundamentado en la separación de la orina y las excretas, donde los segundos son deshidratados con calor, ventilación y la adición de material secante, al reducir la humedad a menos de 35% se acelera la eliminación de patógenos, este sistema es utilizado en México (Rizzardini Villa, 2010). Existe una amplia cantidad de materiales que se pueden utilizar para acelerar el secado, entre ellos se pueden utilizar para disminuir los olores y repeler insectos son cenizas de plantas, arenas finas y polvos de conchas (Hu *et al.*, 2016).

Otro sistema de tratamiento para los biosólidos es el compostaje, el cual es utilizado en Australia, este tratamiento permite que las bacterias, lombrices y otros tipos de organismos descompongan las sustancias orgánicas para producir humus, en este tipo de sistema se descomponen conjuntamente restos de verduras, cáscaras y las heces, el resultado es un mejorador de suelos que, bajo las condiciones adecuadas de ventilación, temperatura y otros factores se encuentra libre de patógenos. Por otro lado, en Noruega se utiliza el sistema de incineración donde tanto las heces como la orina son incineradas a altas temperaturas reduciéndose el volumen de los residuos a 250 mL por mes. De Gisi, Petta y Wendland (2014) proponen la utilización de SES con un sistema de saneamiento Terra Preta (TPS), logrando a bajo costo convertir los biosólidos en un sustrato similar al suelo Terra Preta para ser utilizado en el mejoramiento de estos, en el uso de la agricultura.

### **3.2 Sistema de saneamiento Terra Preta**

Terra Preta (TP) es un suelo antropogénico de color negro, encontrado en el Amazonas desarrollado por personas precolombinas, en una región con una alta infertilidad; sin embargo, el sustrato es actualmente fértil sustentablemente, esta característica es una de las que más llaman la atención de este suelo, ya que han pasado más de 2 000 años y contiene una cantidad elevada de nutrientes. Se reporta 17 mg de N, 13 mg de P y 250 mg de carbono orgánico por hectárea de TPS, lo que representa valores dos veces de N y cuatro veces de P con respecto a los suelos circundantes, teóricamente los recursos naturales que pueden contribuir potencialmente a la alta calidad de nutrientes en la Terra Preta son materiales de plantas acuáticas y basura de compost (ambos ricos en C y N), huesos de peses y mamíferos (ricos en P y Ca) ceniza y materia orgánico carbonizado (ricos en Ca, Mg, K y P) y excrementos humanos y animales (ricos en P y N) (Glaser, 2014).

El índice de Shannon es extensamente utilizado para comparar la diversidad de distintos hábitats, cuyo principal objetivo es obtener una cuantificación estimada de la variedad biológica de la muestra, ya sea en el tiempo o en el espacio, tomando en cuenta dos aspectos la riqueza de las especies y la uniformidad, usualmente los valores se encuentran entre los rangos de 1,50 a 3,50 y escasamente se supera el valor de 4,50 (Ortiz-Burgos, 2016). Sin

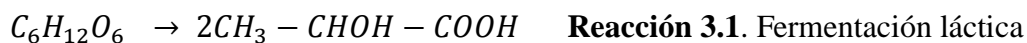
embargo, según Glaser (2014) se reportan valores de 5,2 en el índice de Shannon para la TP y de 4,37 para los suelos adyacentes, superando entonces, las expectativas. Es debido a las características físico-químicas y biológicas antes expuestas que se busca obtener un sustrato similar a la TP, realizándose un sistema de saneamiento con el mismo nombre, el cual se basa en cuatro procesos: una recolección separada de la orina y las excretas, la adición de una mezcla de carbón luego de cada defecación, una fermentación ácido láctica y un subsecuente vermicompostaje (De Gisi, Petta, y Wendland, 2014).



**Figura 3.4.** Sanitarios ecológicos secos ubicados en Malawi.

Fuente: (De Gisi *et al.*, 2014)

La primer fase del TPS es la fermentación ácido láctica (FAL), la cual es un proceso biológico anaeróbico que no produce gas ni olor (De Gisi *et al.*, 2014). Este proceso es llevado a cabo por bacterias ácido lácticas (BAL) y por algunos hongos que metabolizan fácilmente carbohidratos como glucosa, fructosa y sacarosa a piruvato vía glucólisis, la FAL es utilizada comúnmente para fermentar alimentos, la preservación de los mismos y la desinfección de varios organismos patógenos en residuos (Yemaneh *et al.*, 2014). La estequiometría clásica de la fermentación láctica es dada en la reacción 3.1 (Parés y Juárez, 2012):



La mayoría de los estudios realizados con FAL se han llevado a cabo con BAL, aunque los hongos filamentosos como *Rhizopus* pueden metabolizar la glucosa en condiciones aeróbicas para producir ácido láctico, cuentan con la ventaja de requerir un medio simple para la producción de ácido láctico; sin embargo cuentan con una elevada necesidad de aireación (García Mogollón, 2011). Según García Mogollón (2011), se utilizan BAL debido a su rápida fermentación y los sustratos económicos. La habilidad de producir ácido láctico a partir de carbohidratos es la característica común entre este grupo de bacterias Gram positivas, compuesto por 500 especies clasificadas en seis familias: *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Streptococcaceae*, *Leuconostocaceae* y *Lactobacillaceae*; es esta última familia considerada de manera tradicional las BAL genuinas, constituida por los géneros *Lactobacillus* y *Pediococcus*.

La familia *Lactobacillaceae* es la más numerosa y heterogénea con cerca de 180 especies reconocidas; son bacilos o cocobacilos que no forman esporas, pueden ser móviles y generalmente son aerotolerantes. De manera general, el azúcar es la fuente principal de carbón y energía para las BAL, prefieren la glucosa sin embargo, pueden metabolizar otros carbohidratos bajo situaciones de estrés (Mozzi, Raya, y Vignolo, 2015), además, son bacterias no patógenas y reconocidas mayoritariamente como organismos inocuos. Producen dos tipos de fermentación: homoláctica en la que se produce únicamente ácido láctico y heteroláctica (García Mogollón, 2011). El metabolismo heteroláctico es llevado a cabo vía del 6 fosfogluconato/fosfocetolasa, en el cual se genera además de ácido láctico, una importante cantidad de otros metabolitos como etanol, acetato y dióxido de carbono (Villarreal, 2002).

No existe una única estequiometría de fermentación, dependiendo no solo de la bacteria sino también de las condiciones de cultivo, donde se establecerán balances de carbono, (Parés y Juárez, 2012). *Lactobacillus casei* perteneciente a la familia *Lactobacillaceae*, es un lactobacilo mesofílico heteroláctico facultativo, no presenta crecimiento a temperaturas

mayores de 45 °C, tiene requisitos nutricionales complejos y se aísla de mucosa intestinal, de vagina, cavidad oral humana, como así también de productos lácteos (Villarreal, 2002).

Un estudio realizado en Malawi utilizó fermentación ácido láctica en lodo fecal, en este se determinó que la acción antimicrobiana del ácido láctico se encuentra asociada a su capacidad de reducir el pH intercelular, al finalizar una semana de tratamiento se alcanzó un pH de 4,2 y una concentración de *E. coli* bajo el límite detectable de log 2 UFC/mL (Anderson *et al.*, 2015). Otro estudio realizado en Alemania (Yemaneh *et al.*, 2014) demostró que con la utilización de melaza al 5% y 10% como fuente de carbono, se lograba disminuir la concentración de *E. coli* hasta no ser detectable luego de una fermentación de 21 d utilizando una mezcla de BAL (además el valor de pH disminuyó de entre 5,5 y 6, hasta 4,5 y menos de 3,7, asimismo la comparación de distintas concentraciones melaza indican que entre 10 y 15 % se obtiene la mayor concentración final de BAL).

La FAL contribuye a la reducción de patógenos en las excretas; sin embargo, no ha sido suficientemente analizado y caracterizado, depende la fuente de carbohidratos y la duración de la FAL (Andreev, Ronteltap, Boincean, y Lens, 2018). Por otra parte, según Andreev *et al.* (2018) estudios realizados en estiércol porcino demuestran la disminución de *Clostridium* y *Ascaris suum* luego de (7-10) d y 56 d respectivamente. La mayoría de los microorganismos pueden crecer en un amplio rango de pH, la mayoría de las bacterias no pueden crecer en pH menores a 4,6, esto debido a que el pH interno de la mayoría de las células es cercano a 7, es el pH óptimo para el metabolismo de estas, cuando las células microbianas están sujetas a valores de pH extremos, la membrana de la célula se daña. Los iones H<sup>+</sup> y OH<sup>-</sup> pueden filtrarse a la célula, por lo tanto, las enzimas y las moléculas de ácido nucleico se desnaturalizan, lo que lleva a la célula a la muerte. El pH afecta no solo la tasa de crecimiento sino también la supervivencia durante el almacenamiento, la calefacción, el secado y otros tipos de procesamiento (Devahastin, 2010).

El siguiente paso, en el saneamiento TPS, a la FAL es un vermicompostaje que consiste en un proceso de estabilización para el tratamiento de residuos sólidos orgánicos o materia fecal aeróbico, beneficioso para la estructura del suelo, y otras propiedades como la aireación y la capacidad de retener agua (Prabhu *et al.*, 2014) con la utilización de lombrices. Además,

las lombrices mejoran la estabilidad y la porosidad del suelo al excavar galerías, así como las propiedades químicas y biológicas como la tasa de descomposición de la materia orgánica, la disponibilidad de nutrientes, la composición y actividad de los microorganismos y los invertebrados del suelo (Domínguez y Gómez-Brandón, 2010).

El paso del residuo a través del intestino de la lombriz altera su composición química de forma que se incrementa la concentración de nutrientes fácilmente asimilable para los microorganismos los cuales proliferan rápidamente en el residuo recién excretado y terminan de completar su degradación. Además, el mucus segregado por la lombriz y sus excreciones estimulan a proliferación de microorganismo degradadores de materia orgánica en el residuo durante el proceso de vermicompostaje, igualmente el movimiento de las lombrices a través del residuo del que se alimentan promueve su aireación estimulando su biooxidación microbiana. De este modo, gracias a la acción conjunta de lombrices y microorganismos, el residuo orgánico es degradado y parcialmente mineralizado haciéndose más estable y maduro (Canmletti Morales, 2016)

Según Domínguez y Gómez-Brandón (2010), existen tres clasificaciones de lombrices atendiendo sus estrategias de alimentación y formación de galerías, estas son: epigeas, endógenas y anécicas, tradicionalmente son las primeras las que se utilizan en vermicompostaje debido a su capacidad de colonizar residuos orgánicos de forma natural, su tasa de consumo, digestión y asimilación de la materia orgánica, además de su alta tasa reproductiva, como se observa en cuadro 3.1. Es dentro de la categoría ecológica de las Epigeas que se incluyen las lombrices más adecuadas para los procesos de vermicompostaje *Eisenia foetida* y *Eisenia andrei* ambas cuentan con una gran capacidad para adaptarse a las diferentes características de los distintos residuos orgánicos a vermicompostar, ya que poseen un amplio rango de tolerancia al pH, temperaturas y humedad del sustrato, bajo condiciones óptimas llegan a consumir diariamente una cantidad de residuos equivalente a su peso, son longevas entre 4,5 y 5 años (Red Española de Compostaje, 2014).

**Cuadro 3.1.** Resumen de las características utilizadas para diferenciar tres clases ecológicas de lombrices de tierra.

<b>Característica</b>	<b>Epigeas</b>	<b>Endógenas</b>	<b>Anécicas</b>
Tamaño	Pequeño	Grande	Mediano
Excavación	Reducido	Desarrollado	Muy desarrollado
Movilidad	Rápida	Débil	Moderada
Fecundidad	Elevada	Limitada	Moderada
Maduración	Rápida	Baja	Moderada

Fuente: (Red Española de Compostaje, 2014)

El éxito y la eficiencia del vermicompostaje de un residuo orgánico viene condicionado a que este posea una naturaleza y características que permitan un aceptable desarrollo de las lombrices, las principales características a evaluar en los residuos orgánicos que van a ser vermicompostado incluyen la humedad (valores óptimos entre 70 y 90%), concentraciones de oxígeno (entre 55 y 65%), pH (entre 5 y 9, aunque es preferible la neutralidad), relación C/N (entre 20 y 30) y conductividad eléctrica ( $< 8$  dS/m) (Red Española de Compostaje, 2014b). Se ha comprobado una rentabilidad en los cultivos mayores las plantas abonadas con humus de lombriz frente a la acción de los abonos químicos, aumentando la productividad debido a que es un abono orgánico que se adapta a cualquier cultivo (Ochoa Piñuela, 2009).

Según Ochoa (2009) la ventaja principal de este abono es debido a la alta calidad y presencia de ácidos húmicos y fúlvicos que mejoran las condiciones del suelo, aumentando la retención de humedad y estabiliza el pH. Además, valores de pH entre 6,0 y 7,5 son óptimos para el crecimiento de la mayoría de los cultivos, el cual es el valor final promedio.

Adicionalmente, el pH del suelo afecta la actividad de los microorganismos beneficiosos y la disponibilidad de nutrientes. En el caso de la conductividad eléctrica (Ce), valores entre 0-800  $\mu\text{S}/\text{cm}$  son aceptables para el crecimiento de los cultivos (Romero, Santamaría, y Zafra, 2009).

Por otro lado, la relación C:N indica cuántos gramos de C existen por cada g de N, para desplegar la actividad metabólica de los microorganismos, es necesario que exista una buena proporción de N, por encima de 30-50 se considera que un suelo donde N es inmovilizarle, entre (15-30) % se observa una actividad microbiana, pero no una liberación de compuestos nitrogenados. Cuando la relación es por debajo de 15%, se da una liberación de N, debido a la actividad de microorganismos; de tal manera, la planta puede tomar compuestos nitrogenados solubles (Rueda Puente, Barrón Hoyos, y Preciado Rangel, 2009). Por otro lado, la EPA (2000) establece concentraciones máximas de metales en biosólidos que se utilizan en la aplicación de terreno los cuales incluyen arsénico (75 mg/kg) y mercurio (57 mg/kg) : (United States Environmental Agency, 2000).

La importancia de las concentraciones máximas permitidas reside en que el exceso de nutrientes en los biosólidos puede producir lixiviados y llegar a las aguas subterráneas, también es posible que se produzca escorrentía pluvial lo que puede producir una movilización a agua superficial. Sin embargo, debido a que los biosólidos son un fertilizante de liberación lenta, la probabilidad de que los compuestos de nitrógeno; por ejemplo, sean lixiviados de suelos mejorados con biosólido, es menor a la del uso de fertilizantes químicos (Canmletti Morales, 2016).

La dosis por emplear del sustrato producido en el proceso de vermicompostaje dependientes de las características del suelo que se pretende fertilizar y los cultivos. Por ejemplo, se recomienda aplicar a las hortalizas una dosis de 2  $\text{kg}/\text{m}^2$  (Naranjo Valdés, Marínez Reyes y Hernandez Rodríguez, 2015) o bien 1  $\text{kg}/\text{m}^2$ , para praderas se aconsejan 800  $\text{g}/\text{m}^2$ , pero para árboles frutales se aconsejan 2 kg por árbol (Canmletti Morales, 2016).

En Costa Rica, el reuso de aguas residuales está controlado por el Reglamento de Vertido y Reuso de Aguas Residuales N° 33601 y define el agua residual de tipo ordinario como agua generada por las actividades domésticas del hombre (uso de inodoros duchas, lavatorios,



fregaderos, lavado de ropa, etc.). El Reuso es el aprovechamiento de un efluente de agua residual para diversos fines (Ministerio de Salud & Ministerio de Ambiente y Energía, 2017), según el decreto se establecen 8 tipos de reuso de aguas residuales, sin embargo para el uso de biosólidos no se establecen límites. Pero para la disposición el límite máximo permisible es de 2000 UFC/g (Ministerio de Salud, 2015). La OMS establece un límite máximo de 1000 CF/100 ml para el agua de irrigación sin restricción (World Health Organization, 1989). Por otra parte, se establece que el estándar microbiológico a cumplir para biosólidos tratados por un proceso físico, químico o biológico o la combinación de estos tres tipos, debe ser indetectable la presencia de *Salmonella* y *E. coli* O157: H7 (Agencia Chilena para la Inocuidad y Calidad Alimentaria y Servicio Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, 2017).

Al proponer la utilización de SES con el sistema de saneamiento Terra Preta, debe estar respaldado científicamente en la eficiencia de la mejora físico-química del sustrato final, así como la inocuidad producida por la fermentación ácido láctica. Es entonces que este trabajo busca corroborar no solo la mejora físico-química y microbiológica sino también el impacto que genera el uso del mejorador producido en el desarrollo de cultivos con relevancia agroindustrial para el país.

## 4 METODOLOGÍA

La ruta de investigación se basó en la caracterización física, química y biológica del biosólido inicial proveniente de SES (BI) y se realizó una comparación entre dos BAL utilizando como indicador el descenso del valor de pH. Posteriormente se evaluó la eficiencia de la FAL en el BI con distintos tratamientos de oxígeno y fuentes de carbono, dando como resultado un biosólido fermentado (BF) y se evaluó además la capacidad inhibidora de la FAL frente a distintos patógenos indicadores.

Se realizó posteriormente un vermicompostaje al BF con el fin de mejorar las características físico-químicas, obteniendo un biosólido precursor a la Terra Preta (BPTP) tras el vermicompostaje. Se comprobó su capacidad como mejorador de suelo, analizando el crecimiento de un almácigo de lechugas con la adición del sustrato tratado y dos controles (positivo y negativo), desarrollado en un invernadero ubicado en la provincia de Heredia. Las pruebas de laboratorio fueron llevadas a cabo en el Centro de Investigación y de Servicios Químicos y Microbiológicos (CEQIATEC) y los Laboratorios de la Escuela de Ingeniería Ambiental, ambos ubicados en el Tecnológico de Costa Rica.

### ***4.1 Caracterización del biosólido de sanitarios ecológicos secos***

El BI proveniente de SES ubicados en la Zona de los Santos, San José fue almacenado durante 10 meses en las bodegas de la escuela de Ingeniería Agrícola del TEC, posteriormente se le realizó una caracterización a nivel físico, químico y biológico con el fin de conocer las condiciones iniciales.

#### **4.1.1 Caracterización físico-química del sustrato**

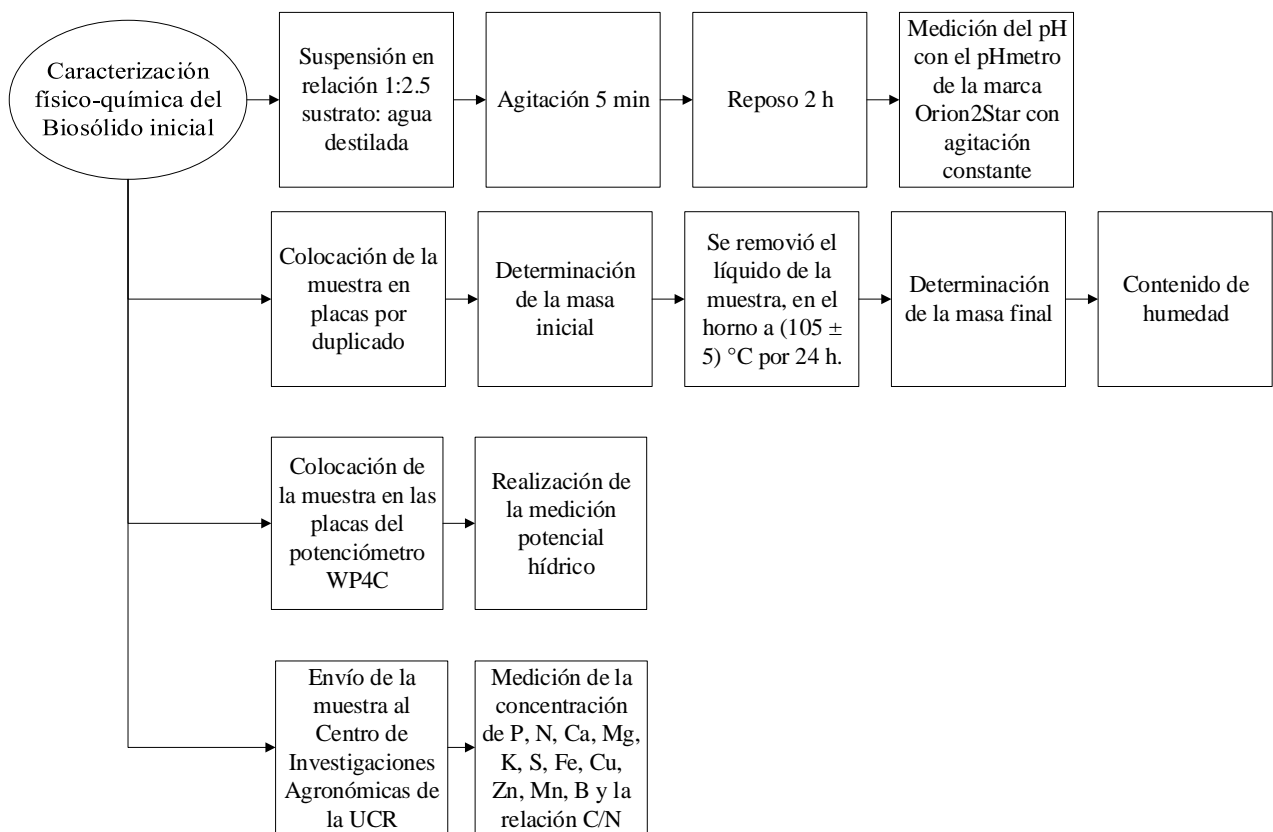
Se realizó una medición del pH utilizando un pH-metro de la marca Orion2Star con el electrodo para materiales semisólidos, para lo cual se realizó una suspensión con relación 1:2,5 del biosólido con agua destilada, esta se agitó vigorosamente durante 5 min y se dejó

reposar 2 h, para una posterior lectura del pH con la mezcla en agitación constante (Zagal y Sadzawka, 2007).

Con el fin de conocer el contenido de humedad y el valor del potencial hídrico se realizaron dos análisis en el Laboratorio de Suelos ubicado en el CEQIATEC, el primero se realizó según el procedimiento ASTM D2216 (ASTM International, 2010), para esto; se colocaron muestras del BI en placas, se determinó la masa por duplicado, se removió el líquido calentando en un horno con una temperatura de  $(105 \pm 5) ^\circ\text{C}$  por 24 h y se midió la masa de las muestras. El cálculo de la humedad del material se realizó utilizando la fórmula 4.1, donde W es el porcentaje de humedad en base húmeda, Mw es la masa de agua contenida en la muestra y Mh es la masa húmeda de la muestra.

$$W = \frac{M_w}{M_h} * 100 \quad \textbf{Fórmula 4.1}$$

Posteriormente se determinó el potencial hídrico del sustrato utilizando el potenciómetro WP4C que consiste en una cámara sellada que determina la humedad relativa del aire en la muestra utilizando el método espejo refrigerado conforme al estándar ASTM 6836-16 (ASTM International, 2016). Fue analizado el porcentaje presente en el BI de fósforo (P), nitrógeno (N), calcio (Ca), magnesio (Mg), potasio (K), azufre (S), hierro (Fe), cobre (Cu), zinc (Zn), manganeso (Mn) y boro (B), así como la relación carbono/nitrógeno (C/N), fue realizado en el Centro de Investigaciones Agronómicas de la UCR (CIA) de la Universidad de Costa Rica, además de la conductividad eléctrica. En la figura 4.1, se muestra un diagrama de la metodología seguida para la caracterización físico-químicamente del BI.



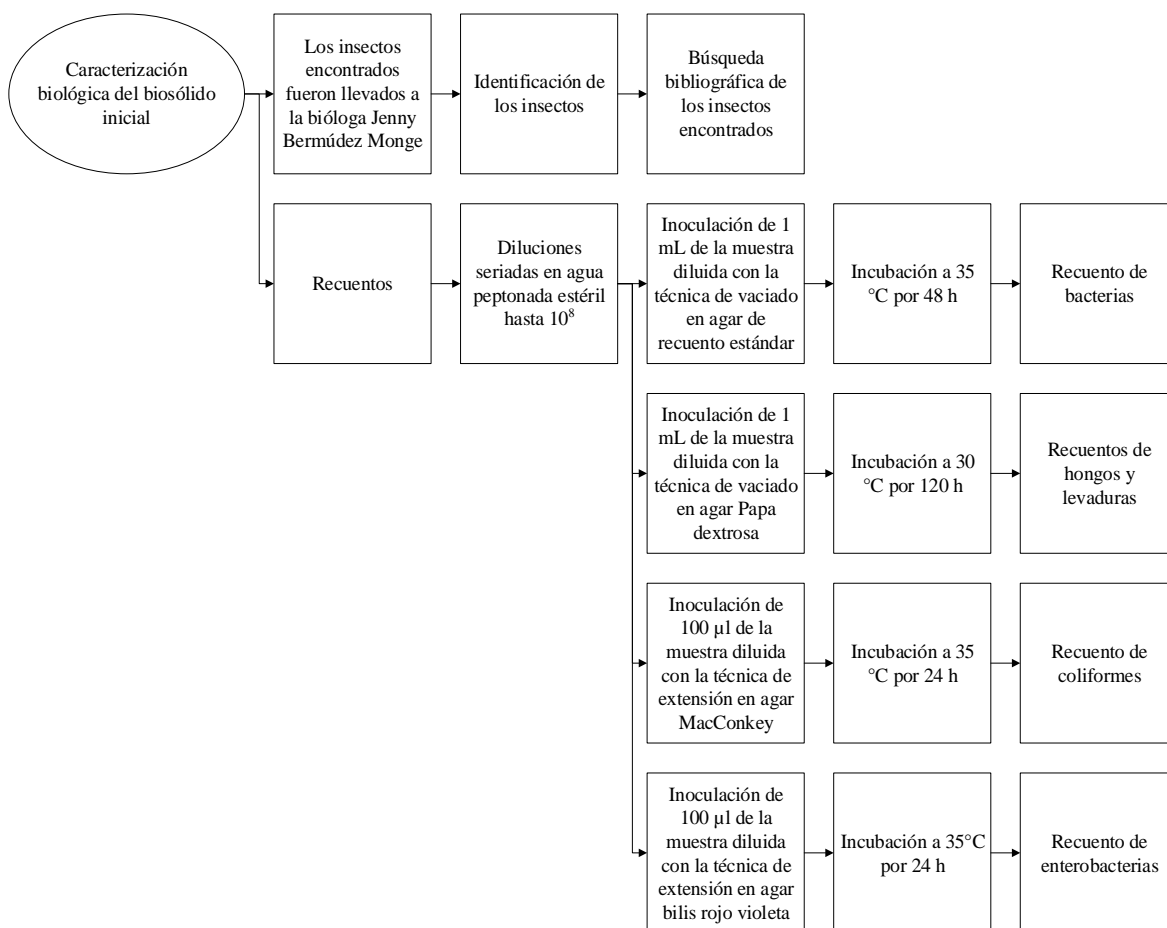
**Figura 4.1.** Diagrama metodológico para la caracterización físico-química del biosólido inicial.

#### 4.1.2 Caracterización biológica del biosólido inicial

El biosólido inicial contenía insectos, estos fueron aislados y caracterizados bajo supervisión de la bióloga Jenny Bermúdez Monge del CEQIATE. Paralelamente se realizó un recuento de bacterias, hongos, coliformes y enterobacterias. Los recuentos se realizaron empleando diluciones seriadas en agua peptonada estéril hasta  $10^8$ . Se determinó la presencia de bacterias patógenas con métodos de enriquecimiento selectivos según la cepa de interés, conforme se presenta en el cuadro 4.1.. En la figura 4.2., se muestra un diagrama de la metodología de recuentos de bacterias, hongos, levaduras, coliformes y enterobacterias además de la identificación de insectos.

**Cuadro 4.1.** Especificaciones para el recuento de microorganismos

Microorganismo	Medio de cultivo	Técnica utilizada
Bacterias	Agar de Recuento Estándar: incubación por $48 \pm 2$ h a $35^{\circ}\text{C}$ (Maturin y Peeler, 2001)	Vaciado: se inoculó por duplicado 1,0 mL de la muestra diluida en las placas, se vertió 20 mL de agar en estado líquido y se homogenizó realizando movimientos circulares.
Hongos y levaduras	Agar Papa Dextrosa con 10% de ácido tartárico: incubación por 5 d a $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$ . (Huang, Hitchins, Tran, y McCarron, 2017)	
Coliformes	Agar MacConkey: incubación por 24 h a $35^{\circ}\text{C}$ (Feng, D. Weagant, y Jinneman, 2018)	Extensión: se inoculó 100 $\mu\text{L}$ de la muestra sobre el agar solidificado y fue extendido utilizando un asa Drigalsky.
Enterobacterias	Agar Bilis Rojo Violeta: incubación (18-24) h a $35^{\circ}\text{C}$ . (Feng, Weagant, Grant, y Burkhardt, 2017)	



**Figura 4.2.** Diagrama metodológico para la identificación de insectos y los recuentos de bacterias, hongos, levaduras, coliformes y enterobacterias, para el biosólido inicial proveniente de sanitarios ecológicos secos.

Se realizó una determinación cualitativa de patógenos indicadores en BI, utilizando el método de enriquecimiento y aislamiento selectivo de microorganismos propuestos por la Asociación Americana de Salud Pública (2001). Debido al posible bajo nivel inicial de microorganismos que se encuentran en una muestra se realizó un enriquecimiento, aumentando la población a una concentración detectable, para esto se da un periodo en las condiciones apropiadas para reparar el daño y activar el metabolismo permitiendo una proliferación de los microorganismos buscados hasta un nivel detectable (American Public Health Association, 2001). Se realizó una búsqueda de *Salmonella*, *Shigella* y *E. coli*

O157:H7 para lo cual se realizó un enriquecimiento a razón de 10 g de sustrato y 90 mL de caldo de enriquecimiento selectivo para cada cepa de interés, se homogeneizó durante 1 min y se incubó durante 24 h a 35°C. Una vez finalizado el período de incubación se realizó un rayado con asa bacteriológica a partir del caldo de enriquecimiento en medios de cultivo sólidos específicos como se muestran en el cuadro 4.2.

**Cuadro 4.2.** Medios de enriquecimiento y cultivo para la aislación de *Salmonella*, *Shigella* y *E. coli* O157 H:7

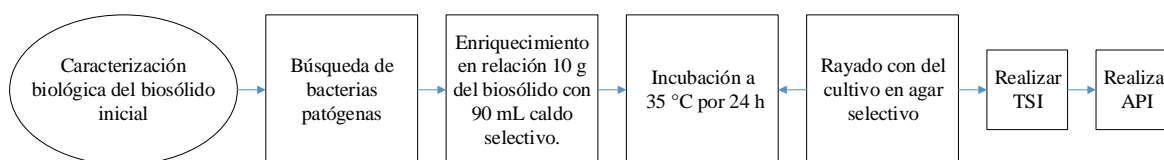
<b>Cepa bacteriana</b>	<b>Caldo de enriquecimiento</b>	<b>Agar selectivo</b>
<i>Salmonella</i>	ANSR	Hektoen: 24 h de incubación a 35°C (Andrews, Wang, Jacobson, y Hammack, 2018). XLD: 24 h de incubación a 35°C (Andrews <i>et al.</i> , 2018).
<i>Shigella</i>	CTS	MacConkey: incubar por 20 h a 35 °C.(Andrews y Jacobson, 2013).
<i>E. coli</i> O157:H7	CTS con Novobiocina (20 µg/L)	MacConkey Sorbitol: incubar 37 °C por 24 h(Feng <i>et al.</i> , 2017)

Se realizaron pruebas bioquímicas básicas para determinar las características metabólicas de las cepas bacterianas aisladas posteriormente a los aislamiento en medios de cultivo selectivos, entre ellas tinción de Gram y la prueba de fermentación de carbohidratos con el medio “triple sugar iron” (TSI) requerida para la identificación de géneros bacterianos. El agar en hierro con azúcar triple (TSI, triple sugar iron), permite diferenciar los géneros *Salmonella* y *Shigella* de otros bacilos gran negativos entéricos como *E. coli*. El medio contiene glucosa al 0.1%, sacarosa al 1%, lactosa al 1%, sulfato ferroso (para la detección de la producción de H<sub>2</sub>S), extracto de tejido (sustrato de crecimiento de proteínas) y un indicador de pH (rojo fenol) (Batt y Tortorello, 2014).

Los tubos de TSI se incubaron a 35-37 °C por 24 h, la lectura se realizó conforme a la coloración presentada. Si el medio permanece de color rojo indica la ausencia de fermentación, si se produce un cambio al color amarillo únicamente en la parte baja del tubo

se produjo fermentación de glucosa, y si se dio un cambio a amarillo en la totalidad del tubo se dio fermentación de sacarosa y/o lactosa, si se produce un precipitado negro las bacterias son productoras de H<sub>2</sub>S y si se formaron burbujas o rupturas del agar es evidencia de producción de gas (Batt y Tortorello, 2014).

La identificación final se realizó con API 20E, un sistema de identificación estándar para la familia Enterobacteriaceae, que consiste en 20 microtubos que contienen sustancias deshidratadas. Esta prueba es inoculada con una suspensión de la bacteria por identificar y durante la incubación se producen cambios de color por reacciones metabólicas, estas son analizadas de acuerdo con una tabla obteniéndose un perfil de identificación. Se debe realizar una suspensión de cada bacteria en 5 mL de agua y se incuba a (35-37) °C por (18-24) h (Batt y Tortorello, 2014). En la figura 4.3. se observa el procedimiento para identificar cualitativamente *Salmonella*, *Shigella* y *E. coli* O157:H7.



**Figura 4.3.** Diagrama metodológico para la identificación cualitativa bacteria patógenas.

#### 4.2 Optimización de la fermentación ácido-láctica.

Se realizó una serie de cuatro ensayos con el fin de optimizar el proceso de fermentación ácido láctica necesaria en el proceso de TPS, inicialmente se realizó una FAL en Erlenmeyers cerrados durante 14 d, inoculando 1 mL de suspensión bacteriana de *Lactobacillus casei* ATCC 0334 y *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 en 100 mL de caldo CTS, como indicador se utilizó la disminución de pH en el medio, para esto se realizaron mediciones en

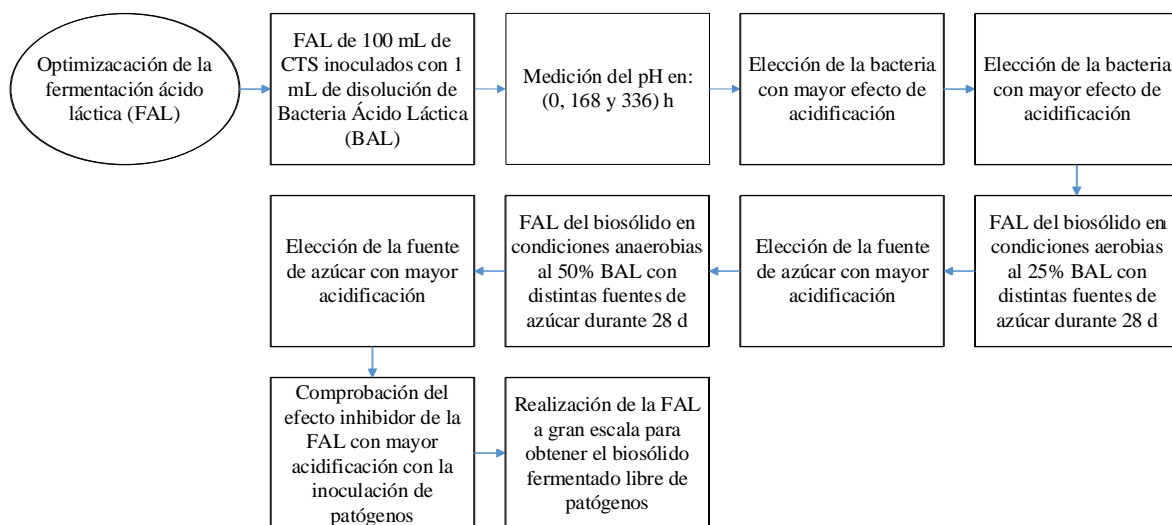


los tiempos 0 h, 168 h y 336 h, utilizando un pH metro Orion 2 Star. Fue elegida la bacteria con mayor rendimiento en la acidificación del medio al cabo de las dos semanas de fermentación. Para la realización de las inoculaciones, se realizaron incubaciones de la cepa de BAL en agar MRS a 36 °C por 24 h, formando colonias pequeñas, blanquecinas de aspecto cremoso (Villarreal, 2002).

Con la bacteria que presentó mayor rendimiento se realizó una fermentación utilizando el biosólido y con la adición de distintas dosificaciones de azúcares (piña, zanahoria y melaza y dextrosa como control), como fuentes de carbono para evaluar el rendimiento de la FAL. Se realizaron mediciones de los grados Brix de las fuentes de azúcar con un refractómetro Vee Gee BX-1. Los ensayos fueron realizados en condiciones aerobias y anaerobias, durante 28 d en ambos casos, para el primero (condiciones aerobias) se adicionaron zanahoria, piña y melaza en concentraciones de 5% y 10 %, se inoculó 10 mL de una suspensión de BAL con por 40 g de sustrato. Se utilizaron distintos controles: el BI con y sin inoculación de BAL, en ambos casos sin adición de azúcar.

La FAL en condiciones anaerobias se logró utilizando sobres de AnaeroGen de la marca Thermo Scientific, para asegurar una concentración menor a 0.1% de O<sub>2</sub> a las 2,5 h y al cabo de 24 h concentraciones entre 7% y 15% de CO<sub>2</sub>. Por cada 40 g de sustrato se inocularon 20 mL de suspensión de *L. casei* y 10 mL de agua estéril. Se realizaron seis tratamientos con diferentes fuentes de azúcar en distintas concentraciones piña y zanahoria al 5%, melaza y glucosa al 10 % y 15%.

Finalmente se eligió el tratamiento con mayor eficiencia tanto de concentración de O<sub>2</sub> como azúcar y concentración de esta, tomando como indicador la disminución del pH alcanzado al concluir las 4 semanas de FAL y se realizó a gran escala con la utilización de 3 jarras herméticas con un volumen de 2 L, replicándose el tratamiento a mayor escala. Se realizaron análisis de pH, relación C/N y patógenos (*Salmonella* y *E. coli*). Además, en otros contenedores se realizó una inoculación de patógenos al BI para observar el comportamiento durante la FAL, en condición anaerobia y el tratamiento de 15% melaza, posteriormente se realizó una búsqueda de *Salmonella* y *E. coli*. En la figura 4.4. se muestra el procedimiento para la optimización de la fermentación ácido láctica.



**Figura 4.4.** Diagrama metodológico para la optimización de la fermentación ácido láctica

### 4.3 Optimización del vermicompostaje

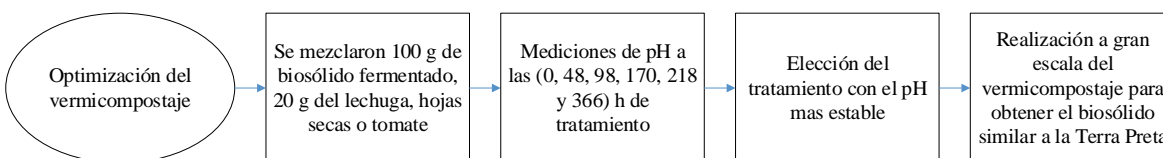
Primeramente, se colocó en contenedores de plástico con agujeros en el fondo, una capa de 10 cm aproximadamente de lombrices Rojas de California (*Eisenia foetida*) con 100 g del sustrato fermentado y con el fin de regular el pH se evaluaron cuatro tratamientos distintos con la adición de 20 g de: tomate, lechuga, hojas secas y un control sin tratamiento. Se colocaron los recipientes en el Laboratorio de uso Múltiple de la Escuela de Ingeniería Ambiental a la sombra. Se realizaron mediciones del pH en los tiempos (0, 48, 98, 170, 218 y 366) h.

El tratamiento con el pH más estable se replicó a gran escala con el biosólido fermentado. Para esto se realizaron por duplicado vermicompostaje con 1 kg de lombrices Roja de California (*Eisenia foetida*) con 600 g de BF y 300 g de hojas recuperadas de desechos de jardín del TEC. Se colocó en el mismo laboratorio de la Escuela de Ingeniería

Ambiental durante 16 d, y se realizaron mediciones de dos veces por semana hasta que se confirmó su estabilización. La adición de desechos de jardín presentó el pH más estable de los ensayos realizados y por esta razón se realizó a mayor escala, además, es una de las materias primas empleadas para alimentar a las lombrices (Acuña Navarro, 2015).

Luego de 15 d se realizó un tamizaje para asegurar un diámetro de partículas menor a 2 mm para la aplicación de este biosólido vermicompostado (BV). Debido que las características que deben cumplir los vermicompostaje para su uso como enmienda de suelos es necesaria la realización de un tamizaje para asegurar un tamaño de partículas entre 1 y 4 mm (Villalobos, Mateos, Orgaz, y Fereres, 2009) y garantizar una relación C:N menor a 20 (Sánchez Bandera, 2017) por lo que se realizó una medición de la concentración de C y N.

Al producto final se le realizaron análisis de concentraciones de N y C las relaciones de estos, así como la concentración de *Salmonella* según lo indica el Centro de Investigación Agronómica, de la Facultad de Ciencias Agroalimentarias, de la UCR (Acuña Navarro, 2015). La figura 4.5. ilustra el procedimiento indicado.

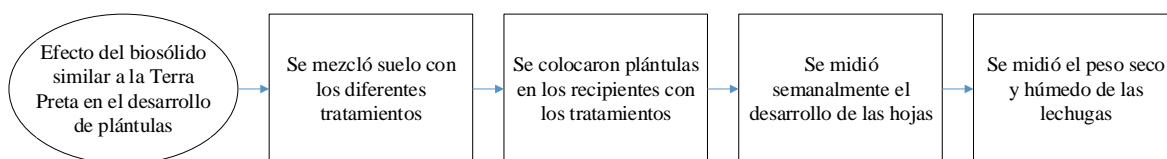


**Figura 4.5.** Diagrama metodológico para la optimización del vermicompostaje.

#### **4.4 Aplicación del mejorador de suelo.**

Se realizó un ensayo *in vivo* con el fin de evaluar el efecto del mejorador de suelo (MS) en el desarrollo de 30 plántulas de lechuga de la variedad Bergam's Green (BG), para esto se realizaron 3 tratamientos al primero se le aplicó 80 cm<sup>3</sup> MS (equivalente a 27 g), el segundo

tratamiento consistió en la aplicación de 80 cm<sup>3</sup> de abono orgánico comercial de la marca Ever Green (AO) y únicamente suelo (S) como control. Las plántulas fueron colocadas en pots con 10 cm de diámetro y 12 cm de profundidad, acondicionados con 1000 cm<sup>3</sup> de suelo. Se permitió que las plantas se adaptaran a las condiciones de cultivo durante una semana y posteriormente se aplicaron los tratamientos. El ensayo tuvo una duración de 28 d, cada 7 d se realizó una medición de la longitud de la hoja exterior de las lechugas como indicador de crecimiento, además de la cantidad de hojas y como análisis final al cumplir 28 d se realizó la medición del peso seco verdadero aéreo (ver figura 4.6.).tras llevarlas a una estufa a 80°C a peso constante, siendo una modificación del procedimiento propuesto donde se determina a 100°C peso seco verdadero aéreo (De la Roza-Delgado, Martínez Fernández, & Agamentería Gutiérrez, 2002).



**Figura 4.6.** Diagrama de la metodología para evaluar el efecto del biosólido similar de la Terra Preta en el desarrollo de plántulas.

#### 4.5 Análisis estadístico

Se analizaron los datos obtenidos en el análisis *in vivo* con el programa Minitab. AL realizarse análisis de varianza (ANOVA) y la comparación de medias para determinar diferencias significativas. Las medias fueron comparadas por la prueba de Tukey al 95% de confianza,

#### **4.6 Evaluación de aspectos económicos**

Se realizó un análisis de costos anuales para la implementación del sistema de saneamiento con el sistema propuesto de 15% de melaza m/m, inóculo de *L. casei* y un posterior vermicompostaje con lombrices *Eisenia foetida* en una vivienda. Para la realización de los cálculos de los costos, se utilizaron los precios de los insumos que se utilizaron en los análisis previos, además, se calculó beneficio económico producto del mejorador de suelo obtenido. Posteriormente se analizó el costo de utilizar un sanitario convencional con tanque séptico, para esto se utilizaron las tarifas del AyA y las tarifas de dos empresas autorizadas en limpieza de tanques sépticos.

## 5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El SES del cual se obtuvo el biosólido inicial, se encuentra en la Zona de los Santos en San José, el mismo tiene una taza separadora, la cual se encarga de realizar una recolección independiente de la orina y heces facilitando el secado y elimina los olores como se mencionó con anterioridad. En la figura 5.1 se observa el sanitario seco con taza separadora,



**Figura 5.1.** Sanitario ecológico seco, ubicado en la Zona de los Santos, San José

Foto tomada por Jorge Calvo

### 5.1 Caracterización del biosólido de sanitarios ecológicos secos

#### 5.1.1 Caracterización fisicoquímica

El biosólido inicial proveniente de SES (BI) presentó un pH de 6,70 (cerca del punto de neutralidad), con un porcentaje de humedad de 66,36% base húmeda y un potencial hídrico

de 4,15 pF encontrándose cerca del punto de marchitez permanente que se da un pF de 4,20 (Pérez Cutillas, González Barberá, y Conesa García, 2015), por lo que se concluyó que no era posible la germinación de plantas en el sustrato bajo esas condiciones. El punto de marchitez permanente se define como el porcentaje de humedad del suelo en el cual la planta se marchita y no es capaz de recuperar su turgencia en una atmósfera saturada de 100% de humedad relativa (Orozco Rodriguez, 2011).

La conductividad eléctrica del sustrato es de 8,10 ms/cm, clasificándose como un sustrato con alta salinidad (Rueda Puente *et al.*, 2009). En el cuadro 5.1. se muestran las concentraciones de los elementos químicos presentes en el sustrato de SES previo a los procedimientos, la relación C:N en BI era 12,53 por lo que esta relación es óptima para el crecimiento de plantas, según lo explica Rueda Puente *et al.* (2009) debido a que se da una liberación de los compuestos nitrogenados.

**Cuadro 5.1.** Elementos presentes en el sustrato de Sanitarios Ecológicos Secos previo a los tratamientos, las mediciones fueron realizadas por el Centro de Investigaciones Agronómicas de la Universidad de Costa Rica.

Elemento	Concentración (g elemento/kg sustrato)	Elemento	Concentración (g elemento/kg sustrato)
N	36,100	S	3,600
K	13,700	Fe	1,631
Ca	8,900	Mn	0,159
P	4,800	Zn	0,122
Mg	3.600	Cu	0,034
B	0,014		

#### 5.1.2 Caracterización biológica

En el BI se encontraron dos tipos de insectos conocidos popularmente como “cochinilla” y “pseudo-escorpión”, los cuales se pueden observar en la figura 5.2.. Los pseudo escorpiones son arácnidos pequeños que tiene un par de pedipalpos quelados, cuatro pares de patas y un abdomen ovado, se parecen superficialmente a los escorpiones; sin embargo,

carecen de cola y picadura. En muchas ocasiones se han encontrados asociados a otros animales, formando asociaciones con insectos voladores adhiriéndose a sus patas u otras partes para trasladarse (Harvey, 2013). La cochinilla pertenece a la superfamilia *Coccoidea*, que cuenta con 8000 especies alrededor del mundo encontradas principalmente en el trópico, presenta amplia variedad morfológica lo que dificulta la clasificación, algunas de las familias son: *Aclerdidae*, *Asterolecaniidae*, *Coccidae* y *Diaspididae* (Barnard, 2011).



**Figura 5.2.** Pseudo-escorpión y cochinilla encontradas en el sustrato sólido de Sanitarios Ecológicos Secos previo a los tratamientos.

La presencia de estos insectos es debido, presuntamente, al ingreso de estos en el período de almacenamiento, como consecuencia de la falta de aislamiento. Cabe aclarar, que estos insectos podrían ser vectores (al igual que las moscas, mosquitos, roedores y pájaros), los cuales pueden transmitir enfermedades directamente a los seres humanos o desempeñar un papel específico como anfitrión en el ciclo vital de un agente patógeno (United States Environmental Agency, 2000). Por otra parte, cuando se realizó la fermentación ácido láctica, se añadió agua destilada con el fin de proporcionar la humedad necesaria para la correcta fermentación, lo que provocó la muerte de estos insectos que se encontraban en el BI. Sin embargo, es necesario mejorar el aislamiento durante el almacenamiento para futuras experiencias. Adicionalmente a esta caracterización de insectos, se realizó la caracterización del BI a nivel microbiológico.



El BI contenía una población bacteriana en una concentración de  $3,5 \times 10^7$  UFC/g, y una población de hongos de  $1,1 \times 10^6$  UFC/g, con respecto a los valores observados normalmente en suelos de  $(1 \times 10^6 - 1 \times 10^8)$  UFC/g de suelo de bacterias y  $(1 \times 10^3 - 1 \times 10^6)$  UFC/g de suelo para hongos (Alvarez Morales, 2009) se encuentra dentro del rango normal de bacterias y supero el rango normal de los hongos, lo que indica que es un sustrato rico en población microbiana lo que según Álvarez Morales (2009) proporciona nutrientes de forma permanente para que el suelo sea fértil y pueda alcanzar un balance que permita el desarrollo ambiental.

Una concentración de coliformes de  $2,8 \times 10^4$  UFC/g, un recuento de enterobacterias de  $1,7 \times 10^6$  UFC/g. La búsqueda de *Salmonella*, *Shigella* y *E. coli* O157 H:7 arrojó resultados negativos para las dos últimas; por el contrario, tras el enriquecimiento en caldo ANSR y el análisis de un inóculo de BI en agares selectivos (Hecktoen y XLD), se logró aislar una cepa presuntamente positiva para *Salmonella*, la cual tras las pruebas bioquímicas del TSI y API 20 E, se logró confirmar que pertenecía a este género bacteriano. Ciertamente, la presencia de enterobacterias tanto *Salmonella* como el grupo coliformes evidencian la necesidad de realizar un saneamiento al BI, con el fin de desinfectarlo y de esta manera obtener un mejorador de suelo que permita una recirculación de nutrientes, sin representar un riesgo a la seguridad de los usuarios, en otras palabras, sin que el uso del mejorador de suelo represente una fuente de contagio con microorganismos patógenos. Según lo indica la Agencia Chilena para la Inocuidad y Calidad Alimentaria *et al.* (2017) tras el proceso es necesario que sea indetectable la presencia de *Salmonella* por lo que se utilizará como indicador de eficiencia del proceso.

## **5.2 Optimización de la fermentación ácido láctica**

Con el fin de determinar la cepa de BAL con mejor capacidad para reducir el pH, se utilizó como indicador la diferencia entre el valor inicial y el final de pH tras una FAL de dos semanas. Se utilizó un control negativo (medios de cultivo sin la adición de BAL) con el propósito de conocer el comportamiento del medio de cultivo bajo las mismas condiciones físicas en las cuales se realizó la FAL. En el cuadro 5.2. se muestran, los valores de pH

iniciales y finales para el control y los caldos de CTS que fueron inoculados con *L. casei* y *L. acidophilus*. El control negativo presentó una disminución de pH de 0,06 unidades, mientras que el inoculado con *L. acidophilus* presentó un aumento de 0,08 unidades contrario a la disminución de 2,12 unidades generada por la presencia de *L. casei* en el medio.

**Cuadro 5.2.** Valores de pH en las FAL realizadas en dos medios de cultivo y dos distintas BAL

BAL	pH		
	0 h	168 h	336 h
Control	7,11	-	7,05
<i>L. casei</i>		5,13	4,99
<i>L. acidophilus</i>		7,10	7,19

Debido al comportamiento presentado en el caldo CTS fermentado por *L. casei*, se eligió esta bacteria como la cepa de interés para realizar la FAL, aumentando la concentración del inóculo puesto que la acidificación en el medio estéril no alcanzó el pH mínimo para inhibir presencia de patógenos. Ya que, se demostró la capacidad de acidificar el medio por parte de la BAL *L. casei* bajo las condiciones de temperaturas presentadas en el laboratorio por lo que se eligió para realizar la FAL del tratamiento TPS. Al utilizar el BI se realizó una adición de distintas fuentes de azúcar con el propósito de mejorar el rendimiento de la FAL, al añadir los carbohidratos necesario para el desarrollo de las BAL según Mozzi (2015), lo que representa una mejora en las condiciones presentadas por el BI. A las fuentes de carbohidratos se les realizó una medición de los grados brix (porcentaje de azúcar), la zanahoria presentó 1 °Bx, la melaza 20 °Bx, la piña 2,5 °Bx, siendo la melaza la fuente con mayor aporte de azúcares.

En el cuadro 5.3. se muestran los pH finales de la FAL realizada con presencia de oxígeno y el inóculo inicial de 10 mL de *L. casei* ( $1,5 \times 10^7$  UFC/mL). Podemos observar que el BI bajo las condiciones aerobias presenta un pH de 5,5 lo que representa una disminución del pH inicial que se encontraba en 6,7., posiblemente debido a la adición de agua destilada y la acción de los microorganismos que se encuentran presentes en el BI. Por

otro lado, el control sin la adición de azúcar presentó un pH final de 5,82; lo que representa también una disminución de pH con respecto al valor de BI.

En contraste con la disminución de casi 2 unidades presentadas por el control de dextrosa el 10%, lo que respalda la teoría de Mozzi (2015) de que con la adición de fuentes externas de azúcar se logra una mejoría en la FAL; sin embargo, el tratamiento de 5% de dextrosa presentó un rendimiento inferior, manteniendo el valor de pH en 6,55 representando un estancamiento, debido a la baja concentración de azúcar, es posible que no existiera una concentración suficiente de carbohidratos para la función de las BAL. No obstante, tanto los tratamientos con zanahoria y piña presentan un aumento de pH final con la concentración de 10% en contraste con los tratamientos de 5% de las mismas fuentes de carbohidratos, donde en ambos casos se presentó una disminución de una unidad de pH, indicando que estas fuentes de azúcar, un aumento en la concentración no representa un aumento en la eficiencia de la FAL.

Por último, el tratamiento de la melaza presenta un comportamiento, donde al aumentar la concentración se produjo una mejor FAL, disminuyendo el pH a 5,33 siendo el tratamiento con 10% presentando la mayor eficiencia. Sin embargo el pH no alcanzó los valores esperados de pH que produjeran una inhibición de patógeno debido a que una acidificación efectiva se produce en pH menores a 4-4,5 (N. Andreev *et al.*, 2017). Por este motivo se realizó una segunda prueba con el fin de optimizar las condiciones, realizándose una inoculación mayor de 20 mL de *L. casei* ( $5,0 \times 10^{10}$  UFC/mL) además de 10 mL de agua estéril ya que al abrir el tratamiento anterior, se observó que el BF presentaba una consistencia muy seca, lo que podría haber afectado el desarrollo de las BAL, se descartaron los tratamientos de zanahoria y piña al 10% ya que, como se observa en el cuadro 5.3. se produjo un aumento del pH con respecto al BI, al igual que los tratamientos de melaza y dextrosa al 5%. Debido a que ninguno de los tratamientos anteriores produjo la disminución necesaria de pH para inhibir el crecimiento y desarrollo de patógenos entre 4-4,5 (N. Andreev *et al.*, 2017), se replicaron los tratamientos con mejor desempeño probando también los tratamientos de melaza y dextrosa al 15%, con el fin de evaluar el comportamiento de la FAL esta vez bajo anaerobiosis.

**Cuadro 5.3.** Valor del pH tras la fermentación ácido láctica con presencia de oxígeno.

<b>Tratamiento (Fuente de carbohidrato adicionado al BI) en condiciones aerobias</b>	<b>Concentración de carbohidrato (%)</b>	<b>Valor de pH final</b>
BI	0	5,55
BI con adición de BAL	0	5,82
Zanahoria	5	5,51
	10	6,72
Piña	5	5,53
	10	7,35
Melaza	5	7,08
	10	5,33
Dextrosa	5	6,55
	10	4,68

En el cuadro 5.4 se presentan los resultados obtenidos en los distintos tratamientos bajo anaerobiosis. Replicándose nuevamente los controles positivos y negativo como se explicaron los tratamientos en aerobiosis. Como es posible observar en cuadro 5.4. el control presenta un pH de 0,1 unidades mayor al inicial, lo que no representa un cambio significativo, lo mismo ocurre con el control con la adición de BAL lo que podría deberse a la inactivación de las bacterias debido a la falta de carbohidratos y con ello una FAL deficiente.

El control con la adición de BAL y dextrosa como fuente de azúcar presentaron una disminución de pH, de manera que se observa un aumento de eficiencia conforme aumenta la concentración de dextrosa. Por otro lado, la adición de zanahoria y piña presentan en ambos casos, un aumento del pH, por lo que se descartaron pues produjeron un efecto contrario al esperado. Finalmente, el tratamiento de melaza presentó los resultados óptimos, particularmente el tratamiento de melaza al 15% fue el que presentó el pH final más bajo de todas los tratamientos. La melaza de caña es la principal fuente de energía de los microorganismos que participan en la fermentación del abono orgánico y favorece entonces la actividad microbiológica. La melaza es rica en potasio, calcio, magnesio y contiene micronutrientes, principalmente boro (Mosquera, 2010). Es un derivado de la agroindustria azucarera, empleada para alimentos, fermentaciones, farmacéuticas, aditivos de alimentos,

producción de etanol y en la industria pecuaria, algunos de sus derivados son ácidos orgánicos, productos biotecnológicos vinazas (Aguilar Rivera, Galindo Mendoza, Fortenelli Martíne, y Contreras Servín, 2011).

**Cuadro 5.4.** Valor de pH final después del tratamiento de la fermentación ácido láctica

<b>Tratamiento (fuente de carbohidrato adicionado a BI) en condiciones anaerobias</b>	<b>Concentración de carbohidrato (%)</b>	<b>Valor de pH final</b>
Control	0	6,75
Control con la adición de BAL	0	6,67
Zanahoria	5	7,11
Piña	5	6,91
Melaza	10	3,7
	15	3,46
Dextrosa	10	5,02
	15	3,67

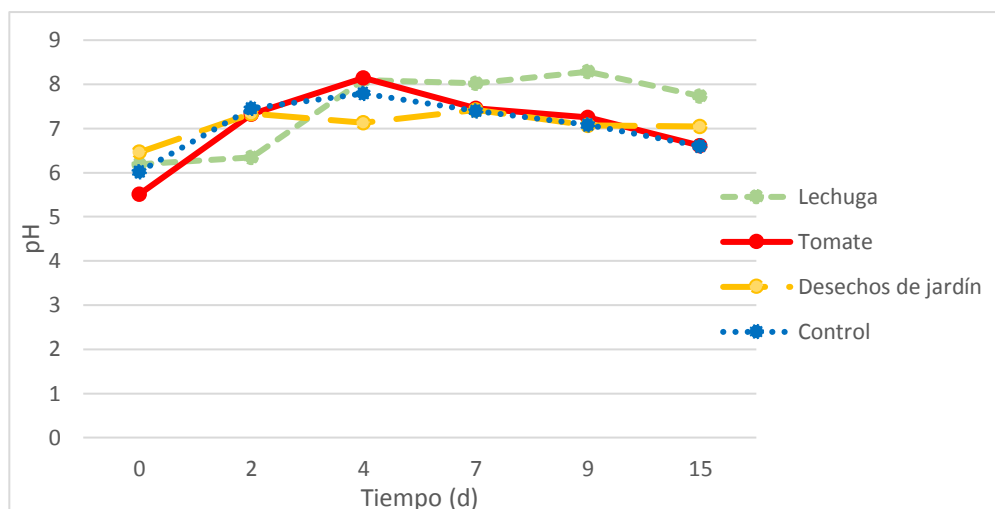
En conclusión, se eligió la anaerobiosis, ya que presentó disminuciones significativas en el pH, además con la adición de BAL en una relación de 1 mL de la suspensión por cada 2 g de BI, al igual que la adición de agua estéril en relación 0,5 ml por cada 2 g de BI para aumentar la humedad de la mezcla, siendo el tratamiento de 15% de melaza el más eficiente. Por otra parte, se realizó una inoculación de *Salmonella* y *E. coli* para comprobar el efecto inhibidor de la FAL con el tratamiento de 15 % de melaza, con la inoculación 5 mL de *E. coli* ( $1,05 \times 10^9$  UFC/mL) y 5 mL de *Salmonella* ( $9 \times 10^{11}$  UFC/mL). Y tras 4 semanas de FAL no se detectó la presencia de *Salmonella* ni de *E. coli* y el pH lo que demuestra que la FAL promueve la inocuidad del BF, por lo que es posible realizar el vermicompostaje, con la certeza de la inhibición de patógenos.

Por otra parte, se realizó a gran escala una FAL con el tratamiento de 15% de melaza por 4 semanas, tras las cuales no se detectó *Salmonella* ni *E. coli* y presentó un pH final de 4,21 por lo que coincide con la teoría de Mozzi (2015) de que entre pH de 4 y 4,5 se produce una inhibición de patógenos. Es biosólido fermentado (BF) cuenta con una relación C:N de 13, lo que según Rueda Puente (2009) representa una relación óptima que permite el crecimiento de plantas. Sin embargo, el pH alcanzado para lograr la inhibición de patógenos, hace necesario buscar una estabilización del mismo, de manera que alcance valores entre 6,00 y 7,50 (Romero *et al.*, 2009) antes de realizar una aplicación en los cultivos.

### **5.3 Optimización del vermicompostaje**

El vermicompostaje realizado al BF inicialmente en lotes de 100 g con la adición de 20 g de los tratamiento de lechuga, tomate y desechos de jardín. En la figura 5.3. se muestra el cambio del pH. Como se observa en la figura 5.3. la adición de los tratamientos y las lombrices presentó un aumento de pH en todos los casos, debido a la mezcla con el sustrato en el que acompaña las lombrices *Eisenia foetida*.

El tratamiento control presenta un aumento de pH durante los primeros 4 d, sin embargo posteriormente presentó una disminución hasta el valor de 6,6 el cual es aceptable, ya que se encuentra en el rango 6,00-7,50 (Romero *et al.*, 2009) sin embargo, presenta una variación de pH que no garantiza que se establecerá dentro del rango óptimo. Por otro lado, el tratamiento lechuga se encontró con un valor de pH superior al recomendado tras los 4 d hasta el final del análisis, por lo que se descarta como tratamiento. El tratamiento de tomate presentó el valor más alto de pH del análisis llegando a 8,15 el día 4 de vermicompostaje, alcanzando un pH final de 6,61, valor óptimo para un abono orgánico; sin embargo, el cambio brusco de pH que sufrió no garantiza que se mantenga en este rango, por lo que se descartó.



**Figura 5.3.** Variación del pH promedio presentado en el vermicompostaje con distintos sustratos.

Finalmente, el tratamiento de desechos de jardín, presento un aumento paulatino de pH, el cual se mantuvo entre los valores de 6,46 (0 d) y 7,42 (7 d), presentando el último día de vermicompostaje el valor de 7,04. Por lo que en ningún momento se encontró un valor de pH fuera del rango de pH ya mencionado como óptimo para un abono orgánico. Siendo el tratamiento elegido, se replicó a gran escala obteniéndose un valor final de pH de 6,58 tras 16 d de vermicompostado. Con una relación final C:N de 12,20 óptima para la aplicación en suelo según Rueda Puente (2009), libre de *Salmonella* con forme lo indica la Agencia Chilena para la Inocuidad y Calidad Alimentaria y Servicio Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria por lo que se procedió a realizar este mejorador de suelos (MS) una prueba *in vivo* con la utilización de lechugas con la aplicación de este.

#### 5.4 Aplicación del mejorador de suelo.

El análisis de crecimiento *in vivo* fue desarrollado durante 4 semanas, una de adaptación por parte de las plantas y 3 semanas tras la aplicación de los tratamiento. La exposición al sol se daba entre las 7:56 am y las 4:10 pm, por lo que contaron con aproximadamente 7 h de sol diarias, además el riego se dio a las 6 de la mañana y de la tarde diariamente con

aproximadamente 80 ml de agua. En la figura 5.4 se observan las plantas luego del trasplante, es posible observar que todas contaban con un volumen y espacio similar para su desarrollo.



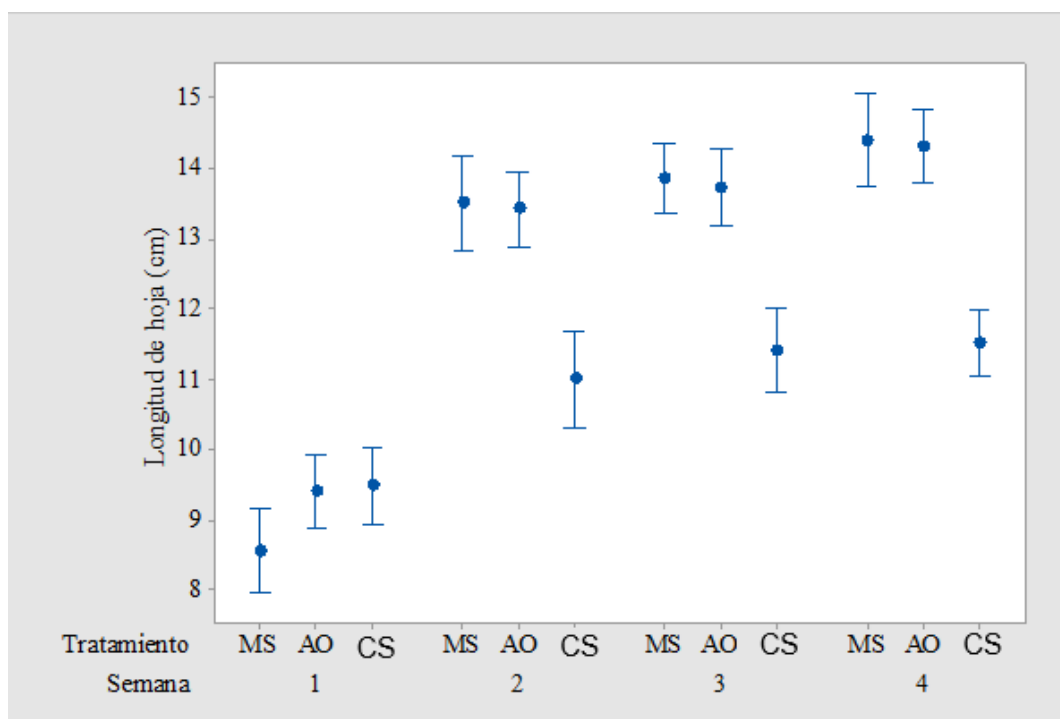
**Figura 5.4.** Plántulas luego del trasplante (0 d).

En el apéndice 1 se observa el comportamiento de los residuos al aplicar la prueba de Tukey en el programa Minitab, con un 95% de confianza se observa que el comportamiento es normal en las gráficas de la izquierda, además de una aleatoriedad de los residuos en la gráfica de orden y una varianza de menos del 5% en la gráfica de ajuste; por lo que fue posible realizar una gráfica de intervalos de confianza, la cual se muestra en la figura 5.5.

Es posible observar en la figura 5.5 el comportamiento presentado por semanas y tratamiento, para la cual en la primer semana no se presentaron comportamientos significativamente diferentes entre los tratamientos del MS, AO y CS, con medias de (8,6; 9,4 y 9,5) cm de longitud de hoja respectivamente, lo cual permite afirmar que al iniciar el análisis no existían diferencias en las plantas. Sin embargo, a partir de la semana 2 se observa una diferencia significativa entre el tratamiento de suelo con respecto a los otros dos tratamientos con un 95% de confianza, mientras que los tratamientos de MS y AO presentan comportamientos no significativamente diferentes con una media para la semana 4 de 14,4



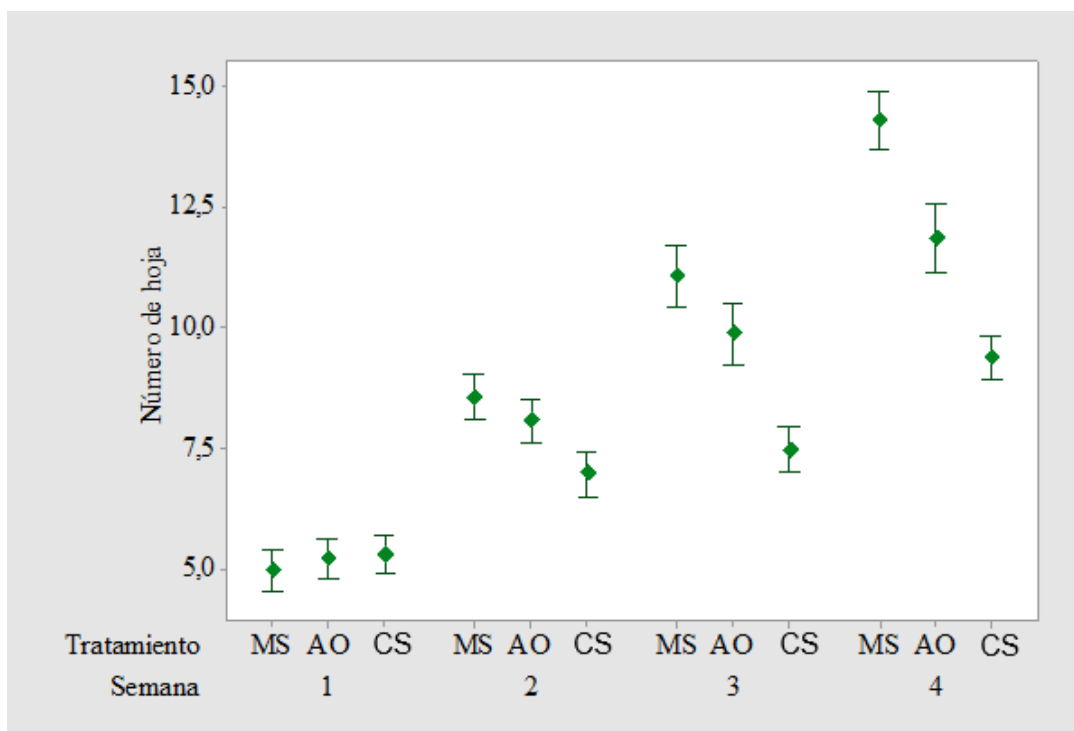
cm y 14,3 cm, siendo los tratamientos con mayor respuesta de longitud de hoja con respecto al tratamiento de CS



**Figura 5.5.** Gráfica de intervalos de longitud de hoja con un 95% de confianza.

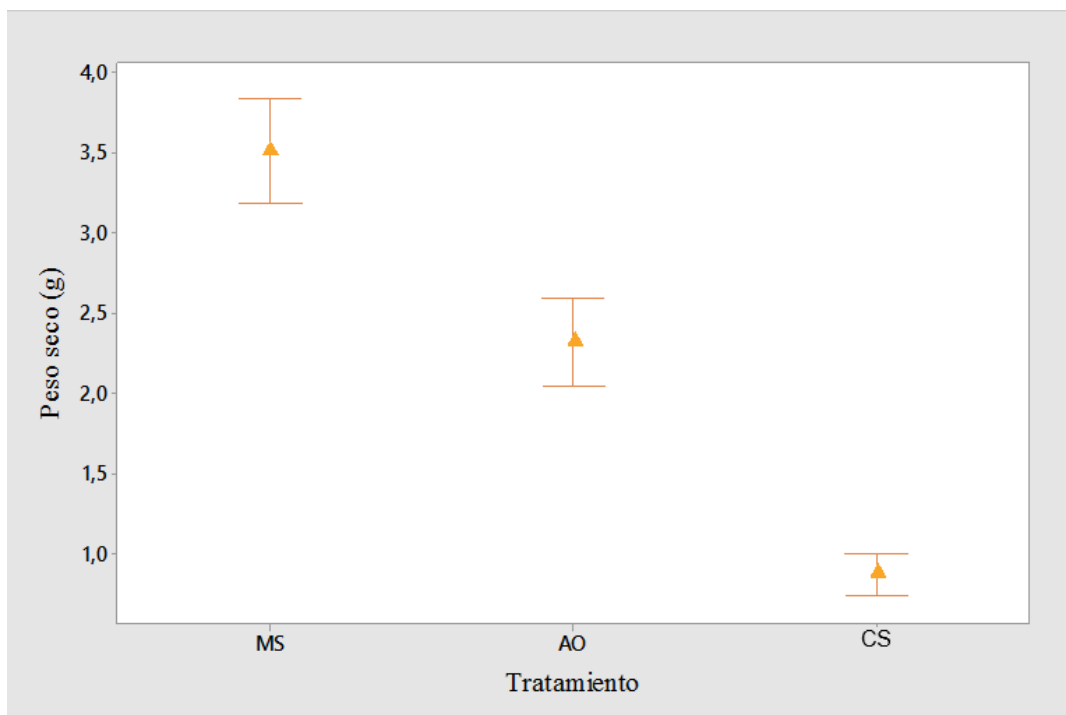
En el apéndice 2 se observan los comportamientos presentados por los residuos de la prueba de Tukey con un 95% de confianza para el número de hojas, los cuales presentaron comportamientos normales como se observan en las gráficas de la izquierda y una varianza de residuos menor al 5% y un orden aleatorio de los mismos, por lo que es posible analizar los intervalos de confianza como se muestran en la figura 5.6.. De igual forma que para el longitud de hojas se observa que no existe una diferencia significativa en el número de hojas en la semana 1 para ninguno de los tratamientos; sin embargo, en la semana 2 y 3 se produjo una diferencia significativa entre el tratamiento S y los otros dos, por el contrario, los tratamientos MS y AO no presentan una diferencia significativa. Esto cambia en la semana

4, en la cual todos los tratamientos son significativamente diferentes al 95% de confianza, donde las medias son aproximadamente 14 hojas para MS, 12 para AO y 9 para CS.



**Figura 5.6.** Gráfica de intervalos para el número de hojas con un 95% de confianza.

En el apéndice 3 se observan los comportamientos presentados por los residuos de la prueba de Tukey con un 95% de confianza para el peso seco verdadero aéreo, los cuales presentaron comportamientos normales como se observan en las gráficas de la izquierda y una varianza de residuos menor al 5% además de un orden aleatorio de los mismos, por lo que es posible analizar los intervalos de confianza. En la figura 5.7. se muestran las medias e intervalos de confianza de los tratamientos donde el comportamiento fue significativamente diferente con medias de 3,51 g para MS, 2,32 g para AO y 0,88 para CS.



**Figura 5.7.** Gráfica de intervalos para peso seco (g) con un 95% de confianza.

En la figura 5.8 se observan 4 de las 9 filas de lechugas, donde es posible visualizar como el crecimiento presentado, la primer fila es del tratamiento MS, la segunda del AO, la tercera de S y la última de MS, es posible observar como la coloración de la tercer fila es un poco menos brillante, ademas de menor en número de hojas y longitud de las mismas con respecto a las demas filas, lo que coincide con lo analizado con anterioridad, ya que en esta semana se presenta una diferencia significativa para el desarrollo. En la figura 5.9. se observa una replica de cada tratamiento al finalizar el análisis, donde es significativamente diferente el número de hojas y el peso seco aéreo de los tres tratamientos y la longitud de la hoja exterior es significativamente distinta para el tratamiento CS, mas no entre MS y AO.



**Figura 5.8.** Desarrollo por parte de las lechugas tras 19 d desde el trasplante.



**Figura 5.9.** Tratamiento con mejorador de suelo producido, abono orgánico comercial y suelo (de Izq. a derecha) tras 4 semanas desde el trasplante.

Tras el análisis de las figuras 5.5, 5.6 y 5.7 en la semana 4 se concluye que al finalizar el análisis *in vivo* las lechugas con el tratamiento CS, presenta un desarrollo significativamente diferente con un 95% de confianza tanto para la longitud y número de hojas como peso seco verdadero aéreo. El tratamiento de MS y AO no presenta una diferencia significativa en la longitud de hoja pero si una diferencia significativa para el número de hojas y el peso seco verdadero aéreo. Tomando en consideración el peso seco verdadero aéreo se observa que la producción es 2,6 veces mayor aproximadamente con la adición de AO frente al tratamiento CS, sin embargo es casi 4 veces mayor al adicionar MS, lo que representa un acortamiento en el tiempo del ciclo productivo, traduciendo en un aumento en el rendimiento de la producción por metro cuadrado de plantación, en este caso lechugas, por lo que hay más producción de masa, lo que representa una mayor ganancia en el tiempo.

### **5.5 Evaluación de aspectos económicos**

En Costa Rica para el 2015 el promedio de habitantes por vivienda fue de 3,4 (Instituto Nacional de Estadística y Censos (INEC), 2017) asumiendo una vivienda con 3 habitantes y utilizando la estimación de Herrera (2011) como base para el cálculo del gasto mensual de agua en el arrastre de excretas, se considera que cada hogar, consume mensualmente 5400 L de agua. Utilizando la tarifa de la Autoridad Reguladora de los Servicios Públicos (ARESEP) cada m<sup>3</sup> tendrá un costo de 721 colones (Autoridad Reguladora de los Servicios Públicos, 2017), anualmente se pagan 46 721 colones aproximadamente en las descargas del inodoro. El Grupo Alto realiza limpiezas de tanques sépticos, y posteriormente realiza un procedimiento de saneamiento obteniendo un mejorador de suelo, la limpieza del tanque séptico tiene un costo aproximado de 35 000 colones. Por lo que el costo anual de contar con tanque séptico es de 81 700 colones aproximadamente.

La producción de las heces es de 51 L/hab/año, con un contenido de humedad del 80% y una deshidratación rápida por parte del agente desecante, donde este equilibra la pérdida de humedad del material seco se estima que se producen anualmente 26,75 L/hab/año (Platzer, Hoffmann, y Ticona, 2008) de BI. Esto equivale a un aproximado de 80,25 L/año

de BI por vivienda, asumiendo que la densidad es 0,36 kg/L siendo similar a la del BI empleado en este trabajo, se obtienen anualmente 167 kg de mejorador de suelos. En el cuadro 5.5 se muestran los insumos necesarios para la ejecución del sistema de saneamiento y el costo. En total el saneamiento TPS tiene un costo de aplicación de 830 000 colones anuales; sin embargo, la producción de mejorador de suelo representa un ahorro de 110 000 colones o bien una ganancia en caso de ser vendida, a 660 colones/kg, que equivale al valor al cual se compró el abono orgánico usado como control en el análisis *in vivo*.

**Cuadro 5.5.** Insumos utilizados por el sistema de saneamiento Terra Preta para el tratamiento de 80 L de biosólido inicial producido en un sanitario ecológico seco.

Tratamiento	Insumo	Cantidad necesaria	Costo unitario	Costo total (colones)
Fermentación ácido láctica	Melaza	4,3 kg	91,46 colones/kg	396
	Inóculo de la BAL <i>L. casei</i>	14,4 L	6000 colones/L	86 670
	Agua Estéril	7,2 L	5000 colones/L	36 1120
Vermicompostaje	Desechos de jardín	26,5 kg	-	-
	Lombrices <i>Eisenia foetida</i>	88 kg	8 000 colones/kg	706 735

Sin embargo, la limpieza de los contenedores se puede realizar cada 3 meses, lo que equivaldría a realizar el saneamiento 4 veces al año, disminuyendo el costo de las lombrices necesarias, debido a que estas pueden ser utilizadas más de una vez, siendo necesario adquirir 22 kg de lombrices equivalentes a 176 000 colones en una única inversión, lo cual reduce el costo del sistema de 207 478 colones al ponerlo en marcha a 30 800 colones trimestralmente. Como se muestra en el cuadro 5.6.

**Cuadro 5.6.** Proyección de costos de los primeros dos años de saneamiento.

Proceso	Insumo	Año 1			
		Trimestre			
		1	2	3	4
Fermentación ácido láctica	Melaza (colones)	99	99	99	99
	Inóculo bacteriana de <i>L. casei</i> (colones)	21.668	21.668	21.668	21.668
	Agua estéril (colones)	9.028	9.028	9.028	9.028
Vermicompostaje	Desechos de jardín (colones)	0	0	0	0
	Lombrices <i>Eisenia</i> (colones)	176.684	0	0	0
Total	Costo (Colones)	207.478	30.795	30.795	30.795
	Mejorador de suelo producido (kg)	42	42	42	42
	Costo unitario (Colones/kg)	4.971	738	738	738

Proyectando el uso del MS a lechugas, es posible obtener el material necesario para aplicar el tratamiento de 4,4% v/v a 6 185 lechugas anualmente, lo que equivale a 1 546 lechugas trimestrales. En el cuadro 5.7 se observa la proyección para el cultivo de lechugas con los tratamientos MS y el AO, estimando los costos con respecto al tratamiento utilizado en el análisis *in vivo*. Donde cada lechuga tendrá un costo de producción de 87,42 colones en caso de usarse el mejorador de suelo o bien 99,18 colones si se adiciona abono orgánico, estos costos proyectados a partir del segundo trimestre, debido a que durante el primero es la puesta en marcha del saneamiento TPS y es necesario adquirir las lombrices lo que no ocurre a partir del segundo trimestre. Además, se estimó un costo de trasplante y de logística por unidad de planta. Colocando en el mercado las lechugas con un costo de 200 colones cada una, se obtienen ganancias de 174 050 colones para el uso de MS y 155 870 colones para el uso de AO. Esto sin tomar en cuenta el crecimiento diferentemente significativo que presentan en la semana 4 del crecimiento en peso seco.

**Cuadro 5.7.** Proyección del costo unitario del cultivo de lechugas.

	<b>Mejorador de suelos</b>	<b>Abono orgánico</b>
	Costo unitario	Costo unitario
Producción Lechugas		
Almacigo de 200 unidades	17,50	17,50
Trasplante	30,00	
		30,00
Tratamiento	19,92	31,68
Logística	20,00	20,00
Total	87,42	99,18

Por lo que se concluye que el uso de SES con el saneamiento TPS, presenta un costo anual mayor, que el uso de inodoros convencionales y tanques sépticos. Sin embargo, al utilizar un saneamiento trimestral y proyectar el uso del mejorador de suelos en cultivos, este es más rentable que el uso del AO. Además, de los beneficios ambientales que puede presentar la utilización tanto del sistema de saneamiento como la aplicación del mejorador de suelos que incluyen la disminución del consumo de agua, del uso de agroquímicos, la eliminación del agua residual y los problemas ya antes mencionados que acarrearán la mezcla de agua potable con excretas y orina y por último y más importante la reincorporación de los biosólidos en los ciclos naturales.



## 6 CONCLUSIONES

El biosólido inicial, proveniente de SES, presenta una relación óptima de C/N de 12,53; sin embargo, el pF (potencial hídrico) presente es de 4,15, encontrándose cerca del punto de marchitez permanente (4,2) es inapropiado para la germinación y crecimiento de plantas. Aunado a esto, hay presencia de *Salmonella* en el biosólido y bacterias ( $3,5 \times 10^7$  UFC/g), hongos ( $1,1 \times 10^6$  UFC/g) siendo un suelo rico en microorganismos. Coliformes ( $2,8 \times 10^4$  UFC/g) y enterobacterias ( $1,7 \times 10^6$  UFC/g), por lo que el uso del biosólido sin un tratamiento previo es desaconsejable.

Al realizar la FAL se obtuvieron resultados óptimos de pH en condiciones de anaerobiosis, con la adición del 15% de melaza, además de la adición de agua estéril y 50% disolución de la BAL *L. casei* ( $5 \times 10^{10}$  UFC/mL). Provocando una inhibición de bacterias patógenas, lo cual se comprobó con la inoculación de 5 mL tanto de *Salmonella* ( $9 \times 10^{11}$  UFC/mL) y *E. coli* ( $1,05 \times 10^9$  UFC/mL). Respaldando la literatura que afirma que la FAL funciona como técnica para inhibir el desarrollo de patógenos.

El vermicompostaje realizado al BF, produjo un aumento en el valor de pH indiferentemente del tratamiento, lo que permite concluir que la participación de las lombrices tiende a neutralizar el medio; sin embargo, no es suficiente para alcanzar una estabilización del pH, por lo que es necesaria la utilización de otro sustrato.

Por otro lado, la utilización de tomates o lechugas durante el vermicompostaje tiende a facilitar la neutralización, pero no la estabilización, como ocurre para el tratamiento con desechos de jardín, donde no solo se da una neutralización sino también una estabilización a partir de los 2 d. Además, el uso de desechos de jardín aporta estructura al vermicompostaje y cuenta con el valor agregado de utilizar desechos durante el proceso.

Tras la FAL y el vermicompostaje el BI paso de un pH de 6,6 a 6,58 y una relación C/N de 12,53 a 12,25, siendo aceptable para su aplicación en suelo además se eliminó la presencia de *Salmonella* por lo que se concluye que el sistema TPS es efectivo para mejorar las condiciones físico-químicas e inhibir el crecimiento de patógenos.

Tras la aplicación del MS en lechugas se concluye que muestra un impacto significativamente diferente al del abono orgánico (1,5 veces aproximadamente) y al del suelo (4 veces aproximadamente) en el crecimiento de plantas tras 28 d de desarrollo tomando como indicador el peso seco verdadero aéreo.

La utilización del sistema de saneamiento Terra Preta acarrea un costo mayor frente al sanitario convencional con tanque séptico. Sin embargo, la utilización del mejorador de suelo resultante presenta una rentabilidad mayor que el uso de abono orgánico en el cultivo de lechugas.

## 7 RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar un aislamiento cuidadoso para el BI antes de ser tratado, evitando el ingreso de insectos, eliminando la posibilidad de contaminación cruzada.

Se recomienda probar el efecto de la utilización de BAL distintas y combinadas, por ejemplo, inóculos tanto de *L. casei* como de *L. acidophilus*, esperando mejorar el rendimiento de la acidificación, lo que posiblemente genere un aumento en la acción inhibidora generada al disminuir el pH. Además, es aconsejable comprobar la acción de la FAL en presencia de helmintos, debido a que la contaminación de estos en el biosólido inicial es posible.

Se sugiere la utilización de otras fuentes de azúcar durante la FAL, buscando un pH final óptimo, además es imperante recalcar la importancia de utilizar las fuentes de azúcar accesibles para las personas o empresas que podrían realizar el TPS. Por lo que es fundamental, estudiar la posibilidad de utilizar desechos de las industrias cercanas en caso de colocarse los SES cerca del origen de algún sustrato que potencialmente funcione como fuente de azúcares. De esta forma se lograría disminuir el volumen de residuos por parte de la industria, así como fomentar una recirculación de nutrientes por medio de la utilización de los mismo como mejorador de suelos.

Se aconseja comprobar la acción del suelo con la adición del MS en posteriores cosechas, esto con el fin de constatar que actúa como una especie de reconstituyente, disminuyendo la necesidad adicionar otros materiales en el suelo luego de su aplicación. Además, de realizar ensayos con diferentes especies de plantas y analizar el efecto que tiene el MS en aplicación directa o superficial en diferentes concentraciones.

Se recomienda realizar un análisis químico del MS luego del uso, para constatar que se realiza una absorción de los elementos a la planta. Además de recolectar el agua luego del riego, para observar cómo se comporta la lixiviación de los elementos presentes en el sustrato.

## 8 REFERENCIAS

- Acuña Navarro, O. (2015). Elaboración de abonos orgánicos. *Serie de Notas Técnicas, 1*, 1–7. Recuperado de [http://www.cia.ucr.ac.cr/pdf/tarifas/Nota tecnica 2\\_2014 Elaboración de abonos organicos en Costa Rica.pdf](http://www.cia.ucr.ac.cr/pdf/tarifas/Nota_tecnica_2_2014_Elaboracion_de_abonos_organicos_en_Costa_Rica.pdf)
- Agencia Chilena para la Inocuidad y Calidad Alimentaria, y Servicio Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. (2017). *Uso y Manejo de Abonos Orgánicos*. Recuperado de [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/290745/Gu\\_a\\_Abonos\\_Org\\_nicos\\_.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/290745/Gu_a_Abonos_Org_nicos_.pdf)
- Aguilar Rivera, N., Galindo Mendoza, G., Fortanelli Martínez, J., y Contreras Servín, C. (2011). Factores de competitividad de la agroindustria de la caña de azúcar en México. *Región y Sociedad, XXIII*(52), 261–297. Recuperado de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1870-39252011000300009&script=sci\\_arttext&lng=pt](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1870-39252011000300009&script=sci_arttext&lng=pt)
- Álvarez Morales, J. C. (2009). *La calidad microbiológica del suelo y del compost del parque Itchimbia en su proceso de recuperación*. Universidad de las Fuerzas Armadas. Recuperado de <https://repositorio.espe.edu.ec>
- American Public Health Association. (2001). *Microbiological examination of foods*. Washington, DC: American Public Health Association.
- Anderson, C. ... Brdjanovic, D. (2015). Lactic Acid Fermentation, Urea and Lime Addition: Promising Faecal Sludge Sanitizing Methods for Emergency Sanitation. *International Journal of Environmental Research and Public Health, 12*(11), 13871–13885. <https://doi.org/10.3390/ijerph121113871>
- Andreev, N., Ronteltap, M., Boincean, B., and Lens, P. N. L. (2018). Lactic acid fermentation of human excreta for agricultural application. *Journal of Environmental Management*,

206, 890–900. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.11.072>

Andreev, N. ... Lens, P. N. L. (2017). Lactic acid fermentation of human urine to improve its fertilizing value and reduce odour emissions. *Journal of Environmental Management*, 198, 63–69. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.04.059>

Andrews, W. H., y Jacobson, A. (2013). *Shigella*. In *Bacteriological Analytical Manual* (8th ed.). Food and Drug Administration. Recuperado de <https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070789.htm>

Andrews, W. H., Wang, H., Jacobson, A., y Hammack, T. (2018). *Salmonella*. In *Bacteriological Analytical Manual* (8th ed.). Food and Drug Administration. Recuperado de <https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070149.htm#Media>

Angulo Zamora, F. (2015). *Gestión del recurso hídrico y saneamiento en Costa Rica. Vigésimoprimer Informe Estado De La Nación En Desarrollo Humano Sostenible*. Recuperado de [http://estadonacion.or.cr/files/biblioteca\\_virtual/021/ambiente/Angulo\\_RH\\_y\\_saneamiento.pdf](http://estadonacion.or.cr/files/biblioteca_virtual/021/ambiente/Angulo_RH_y_saneamiento.pdf)

Ministerio de Agricultura y Ganadería. Reglamento de agricultura orgánica N° 29782-MAG (2001). Costa Rica. Recuperado de <http://www.mag.go.cr/legislacion/2001/de-29782.pdf>

ASTM International. (2010). *ASTM D2216-10 Standard Test Methods for Laboratory Determination of Water (Moisture) Content of Soil and Rock by Mass*. West Conshohocken, PA. Recuperado de [www.astm.org](http://www.astm.org)

ASTM International. (2016). *ASTM D6836-16 Standard Test Methods for Determination of the Soil Water Characteristic Curve for Desorption Using Hanging Column, Pressure Extractor, Chilled Mirror Hygrometer, or Centrifuge*. West Conshohocken, PA. Recuperado de [www.astm.org](http://www.astm.org)

- Autoridad Reguladora de los Servicios Públicos. (2017). Tarifa Acueducto AYA 2017-2021. Retrieved March 2, 2019, from [https://aresep.go.cr/agua-potable/index.php?option=com\\_content&view=article&id=2199&catid=58](https://aresep.go.cr/agua-potable/index.php?option=com_content&view=article&id=2199&catid=58)
- Barnard, P. C. (2011). *Royal Entomological Society Book of British Insects*. Hoboken, United Kingdom: John Wiley & Sons, Incorporated. Recuperado de <https://ebookcentral.proquest.com>
- Batt, C. A., y Tortorello, M. Lou. (2014). *Encyclopedia of food microbiology* (second). California. Recuperado de <https://books.google.co.cr/books?id=1b1CAgAAQBAJ&pg=PA233&dq=API+20E&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiNh5bfm6fgAhVGPN8KHZ4uBJkQ6AEIQTAD#v=onepage&q=API 20E&f=false>
- Bermúdez, M. (2015, July 6). La irrupción de la Costa Rica de los 5 millones. *Gobierno de Costa Rica*. Recuperado de <http://gobiernocr.administracionsolisrivera.cr/la-irrupcion-de-la-costa-rica-de-los-5-millones/>
- Brooks, G., Carroll, K., Morse, S., y Mietzner, T. (2010). *Microbiología médica*. (MacGraw-Hill Internamericana Editores S.A. de C.V., Ed.) (25th ed.). Ciudad de México. Recuperado de [http://redlagrey.com/files/Microbiologia\\_Medica\\_Jawetz\\_25\\_www.rinconmedico.smfy.com.pdf](http://redlagrey.com/files/Microbiologia_Medica_Jawetz_25_www.rinconmedico.smfy.com.pdf)
- Canmletti Morales, J. (2016). *Estudio del vermicompostaje de compos de residuos orgánicos de distinta naturaleza*. Universidad Miguel Hernández de Elche. Recuperado de <http://dspace.umh.es/bitstream/11000/2820/1/TFM Camiletti Morales%2C Justin.pdf>
- De Gisi, S., Petta, L., y Wendland, C. (2014). History and Technology of Terra Preta Sanitation. *Sustainability*, 6(3), 1328–1345. <https://doi.org/10.3390/su6031328>
- De la Roza-Delgado, B., Martínez Fernandez, A., y Agamentería Gutiérrez, A. (2002). Determinación de materia seca en pastos y forrajes a partir de la temperatura de secado para análisis. *Pastos*, XXXII, 91–104.

- Devahastin, S. (2010). Effect of Processing on Microbial Growth and Inactivation in Foods. In *Physicochemical Aspects of Food Engineering and Processing*. CRC Press. Recuperado de [https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt011NT2U5/physicochemical-aspects/time BT - Physicochemical Aspects of Food Engineering and Processing](https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt011NT2U5/physicochemical-aspects/time%20BT%20-%20Physicochemical%20Aspects%20of%20Food%20Engineering%20and%20Processing)
- Domínguez, J., y Gómez-Brandón, M. (2010). *Ciclos de vida de las lombrices de tierra aptas para el vermicompostaje*. *ACTA ZOOLOGICA MEXICANA (N.S.)* (Vol. 26). Recuperado de [http://www1.inecol.edu.mx/azm/AZM26-esp\(2010\)/AZM-Esp-23-Dominguez-Gomez.pdf](http://www1.inecol.edu.mx/azm/AZM26-esp(2010)/AZM-Esp-23-Dominguez-Gomez.pdf)
- Factura, H. ... Otterpohl, R. (2014). The Implementation and Practices of Terra Preta Sanitation in the Tropics The Experiences from Xavier University Ateneo de Cagayan Cagayan de Oro City, Philippines, 1–8.
- Feng, P., D. Weagant, S., y Jinneman, K. (2018). Darrheagenic Escherichia Coli. In *Bacteriological Analytical Manual*. Food and Drug Administration. Recuperado de <https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070080.htm>
- Feng, P., Weagant, S. D., Grant, M. A., y Burkhardt, W. (2017). Enumeration of Escherichia coli and the Coliform Bacteria. In *Bacteriological Analytical Manual*. Food and Drug Administration. Recuperado de <https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm064948.htm>
- Garcia Mogollon, C. A. (2011). *Producción de ácido L(+) láctico a partir de lactosuero utilizando Lactobacillus casei en un cultivo batch*. Universidad de Córdoba. Recuperado de [https://www.unicordoba.edu.co/images/2\\_PRODUCION\\_DE\\_ACIDO\\_L\\_LACTICO\\_A\\_PARTIR\\_DE\\_LACTOSUERO\\_UTILIZANDO\\_Lactobacillus\\_casei\\_EN\\_UN\\_CULTIVO\\_BATCH.pdf%0A](https://www.unicordoba.edu.co/images/2_PRODUCION_DE_ACIDO_L_LACTICO_A_PARTIR_DE_LACTOSUERO_UTILIZANDO_Lactobacillus_casei_EN_UN_CULTIVO_BATCH.pdf%0A)
- Glaser, B. (2014). *Potencial and constraints of Terra Preta productions for soil amelioration and climate changes mitigation*. in: Bettendorf, T; Wendland, C; Otterpohl, R. Recuperado de <http://www.terra-pretas-sanitation.net>

- Granados, M. C. (2009). *Sanitarios Ecológicos Secos como elemento de regularización de asentamientos humanos*. Universidad Autónoma de México.
- Harvey, M. (2013). Pseudoscorpions of the World. Recuperado de <http://www.museum.wa.gov.au/catalogues/pseudoscorpions>
- Herrera Cervantes, G. (2011). *Propuesta para el uso eficiente del agua potable en el Distrito Oriental del Cantón Central de la Provincia de Cartago*. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Recuperado de <https://repositoriotec.tec.ac.cr/bitstream/handle/2238/5673/propuesta-uso-eficiente-agua-potable.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Herrera Murillo, J. (2017). *Uso y estado de los recursos: recurso hídrico. Informe estado de la nación en desarrollo humano sostenible 2017*. Recuperado de [https://estadonacion.or.cr/files/biblioteca\\_virtual/023/Ambientales/Herrera\\_J\\_2017a.pdf](https://estadonacion.or.cr/files/biblioteca_virtual/023/Ambientales/Herrera_J_2017a.pdf)
- Hu, M., Fan, B., Wang, H., Qu, B., y Zhu, S. (2016). Constructing the ecological sanitation: a review on technology and methods. *Journal of Cleaner Production*, 125, 1–21. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.03.012>
- Huang, J., Hitchins, A. D., Tran, T. T., y McCarron, J. E. (2017). Microbiological Methods for Cosmetics. In *Bacteriological Analytical Manual*. Food and Drug Administration. Recuperado de <https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm565586.htm>
- Instituto Costarricense de Acueductos y Alcantarillados. (2016). *Política Nacional de Agua Potable de Costa Rica, 2017-2030. Comisión Interinstitucional*. San José. Recuperado de [https://www.aya.go.cr/Noticias/Documents/AyA Política Nacional de Agua Potable de Costa Rica 2017-2030.pdf](https://www.aya.go.cr/Noticias/Documents/AyA%20Pol%C3%ADtica%20Nacional%20de%20Agua%20Potable%20de%20Costa%20Rica%202017-2030.pdf)
- Instituto Costarricense de Acueductos y Alcantarillados (AyA), Ministerio de Ambiente y Energía (MINAE), y Ministerio de Salud (MS). (2016). *Política Nacional de Saneamiento en Aguas Residuales 2016-2045*. Recuperado de



<https://www.aya.go.cr/Noticias/Documents/Politica Nacional de Saneamiento en Aguas Residuales marzo 2017.pdf>

Instituto Costarricense de Acueductos y Alcantarillados, Dirección de Agua del MINAE, y Fondo Regional de Caribe para la Gestión de las Aguas Residuales. (2016). *Proceso de Capacitación a ASADAS en Saneamiento*.

Instituto de Tecnologías Sustentables. (2016). *Sistemas de saneamiento seco con separación de orina(baño seco)*.

Instituto Nacional de Estadística y Censos (INEC). (2017). Anuario Estadístico 2014-2015 “Compendio de datos del país.” Recuperado de <http://www.inec.go.cr/sites/default/files/documentos-biblioteca-virtual/reanuario2014-2015.pdf>

Maturin, L., y Peeler, J. T. (2001). Aerobic Plate Count. In *Bacteriological Analytical Manual* (8th ed.). Food and Drug Administration. Recuperado de <https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm063346.htm>

Ministerio de Salud. Reglamento para el manejo y disposición final de lodos y biosólidos (2015). Recuperado de [https://www.imprentanacional.go.cr/pub/2015/12/02/ALCA106\\_02\\_12\\_2015.pdf](https://www.imprentanacional.go.cr/pub/2015/12/02/ALCA106_02_12_2015.pdf)

Ministerio de Salud, y Ministerio de Ambiente y Energía. Reglamento de Vertido y Reuso de Aguas Residuales (2017). Costa Rica. Recuperado de [http://www.pgrweb.go.cr/scij/Busqueda/Normativa/Normas/nrm\\_texto\\_completo.aspx?param1=NRTC&nValor1=1&nValor2=85219&nValor3=110118&param2=1&strTipM=TC&lResultado=1&strSim=simp](http://www.pgrweb.go.cr/scij/Busqueda/Normativa/Normas/nrm_texto_completo.aspx?param1=NRTC&nValor1=1&nValor2=85219&nValor3=110118&param2=1&strTipM=TC&lResultado=1&strSim=simp)

Mosquera, B. (2010). *Manual para elaborar y aplicar abonos y plaguicidas orgánicos: Abonos orgánicos, protegen el suelo y garantizan alimentación sana*. Recuperado de [http://www.fonag.org.ec/doc\\_pdf/abonos\\_organicos.pdf](http://www.fonag.org.ec/doc_pdf/abonos_organicos.pdf)

Motarjemi, Y., y Lelieveld, H. (2014). Control of Pathogens by pH and Acidity. In *Food*

*Safety Management - A Practical Guide for the Food Industry*. Elsevier. Recuperado de [https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt00C6IC41/food-safety-management/control-pathogens-by BT](https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt00C6IC41/food-safety-management/control-pathogens-by-BT) - Food Safety Management - A Practical Guide for the Food Industry

Mozzi, F., Raya, R. R., y Vignolo, G. M. (2015). *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria : Novel Applications*. (I. Raúl R. Raya, y Graciela M. Vignolo, John Wiley & Sons, Ed.). New York, UNITED KINGDOM: John Wiley & Sons, Incorporated. Recuperado de <http://ebookcentral.proquest.com>

Naranjo Valdés, M., Marínez Reyes, E., y Hernandez Rodríguez, M. (2015). *Manejo agroecológico de suelos agrícolas*. Carchí. Recuperado de <http://ezproxy.itcr.ac.cr:2138/visor/45542>

Ochoa Piñuela, J. I. (2009). *Beneficios que ofrece el humus de lombriz a los cultivos de manzana*. Córdoba, ARGENTINA: El Cid Editor | apuntes. Recuperado de <http://ebookcentral.proquest.com/>

Olmo Prieto, M. (2016). *Efectos del biochar sobre el suelo , las características de la raíz y la producción vegetal*. Universida de Córdoba. Recuperado de <https://helvia.uco.es/bitstream/handle/10396/13381/2016000001398.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Organización Mundial de la Salud. (2006). *Guías para la calidad del agua potable* (3rd ed., Vol. 1). Recuperado de [https://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/dwq/gdwq3\\_es\\_full\\_lowres.pdf](https://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq3_es_full_lowres.pdf)

Organización Mundial de la Salud. (2019). Saneamiento. Retrieved July 6, 2018, from <http://www.who.int/topics/sanitation/es/>

Orozco Rodriguez, R. (2011). *Efectos de abonos orgánicos sobre las características agronómicas, el rendimiento y la calidad de fruta de la variedad de mora “Vino” (Rubus adenotrichus Schtdl.), en dos zonas de Costa Rica*. Universidad Nacional de Costa Rica. Recuperado de <http://repositorio.conicit.go.cr:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/79/Rafael>

Orozco R. Tesis versión final%2C mayo 2011..pdf?sequence=1&isAllowed=y

Ortiz-Burgos, S. (2016). Shannon-Weaver Diversity Index. In M. J. Kennish (Ed.), *Encyclopedia of Estuaries* (pp. 572–573). Dordrecht: Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-94-017-8801-4\\_233](https://doi.org/10.1007/978-94-017-8801-4_233)

Parés, R., y Juárez, A. (2012). *Bioquímica de los microorganismos*. Barcelona. Recuperado de [www.reverte.com](http://www.reverte.com)

Pérez Cutillas, P., González Barberá, G., y Conesa García, C. (2015). Estimación de la humedad del suelo a niveles de capacidad de campo y punto de marchitez mediante modelos predictivos a escala regional. *Boletín de La Asociación de Geógrafos Españoles*, 68(68), 325–345. <https://doi.org/10.21138/bage.1864>

Platzer, C., Hoffmann, H., y Ticona, E. (2008). Alternativas para un Saneamiento Convencional -Estudio Comparativo- Limitaciones y Potencial. Perú. Recuperado de <http://www.rotaria.net/peru3/rotaria/files/ponencias/ALTERNATIVAS PARA UN SANEAMIENTO CONVENCIONAL.pdf>

Prabhu, M., Horvat, M., Lorenz, L., Otterpohl, R., Bettendorf, T., y Mutnuri, S. (2014). *Terra Preta as an Alternative for the Management of Sludge from Wastewater Treatment Plants*.

*Programa Estado de la Nación*. (2017). San José. Recuperado de <https://www.estadonacion.or.cr/2017/assets/en-23-2017-book-low.pdf>

Red Española de Compostaje. (2014b). *Vermicompostaje: procesos, productos y aplicaciones*. Mundi-Prensa. Recuperado de <https://ebookcentral.proquest.com>

Rice, E. W., Baird, R. B., Eaton, A. D., y Clesceri, L. S. (2012). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (22nd ed.). American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation.

Rizzardini Villa, M. F. (2010). *Baños secos: Gestión y aprovechamiento*. Universidad

Politécnica de Cataluña, España. Recuperado de <https://www.researchgate.net/publication/295919386>

Romero, M. P., Santamaría, D. M., y Zafra, C. A. (2009). Bioingeniería y suelo: abundancia microbiana, pH y conductividad eléctrica bajo tres estratos de erosión. *Umbral Científico*, 15, 67–34. Recuperado de <https://www.redalyc.org/html/304/30415144008/>

Rueda Puente, E. O., Barrón Hoyos, J. M., y Preciado Rangel, P. (2009). *La salinidad: ¿un problema o una opción para la agricultura?* México, D.F: Plaza y Valdés, S.A. de C.V. Recuperado de <http://ebookcentral.proquest.com>

Salgot, M., y Folch, M. (2018). Wastewater treatment and water reuse. *Current Opinion in Environmental Science & Health*, 2, 64–74. <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2018.03.005>

Sánchez Bandera, J. M. (2017). *Vermicompostaje de residuos orgánicos con lombrices del género Eisenia caracterización del producto*. Universidad de Sevilla. Recuperado de [https://idus.us.es/xmlui/bitstream/handle/11441/64332/TFG\\_Juan\\_Manuel\\_Sanchez\\_Lombricultura.pdf?sequence=7](https://idus.us.es/xmlui/bitstream/handle/11441/64332/TFG_Juan_Manuel_Sanchez_Lombricultura.pdf?sequence=7)

United Nations International Children's Emergency Fund, y World Health Organization. (2017). *Progress on Drinking Water, Sanitation and Hygiene*.

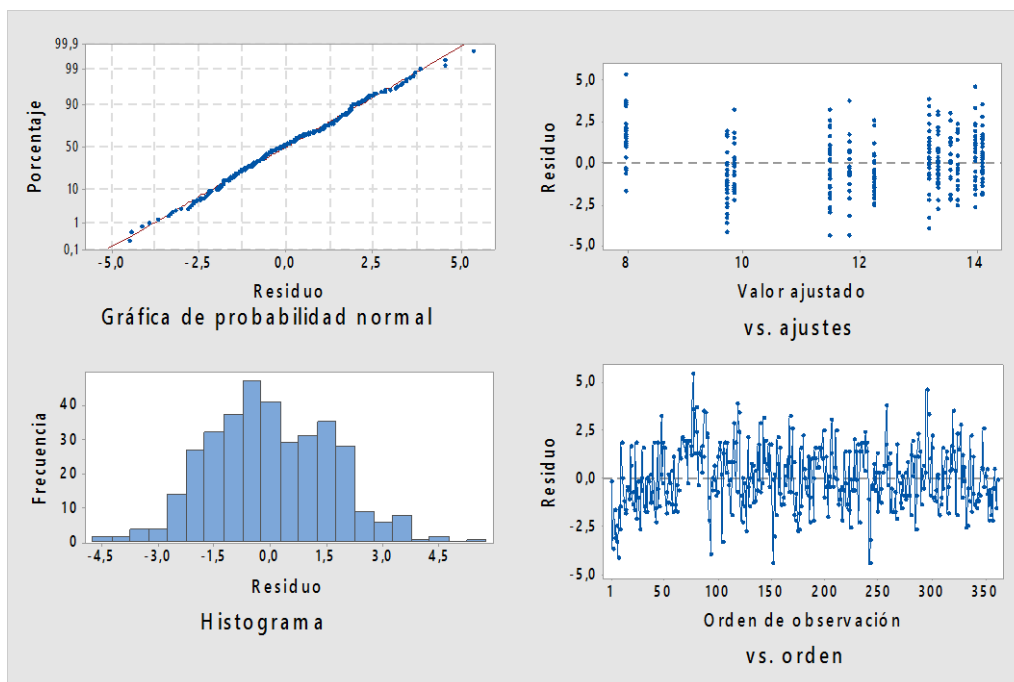
United States Environmental Agency. (2000). *Folleto informativo de tecnología de biosólidos: Aplicación de biosólidos al terreno*. Recuperado de <https://nepis.epa.gov/Exe/ZyPDF.cgi/P1008DQ3.PDF?Dockey=P1008DQ3.PDF>

Valverde, R. (2013). El agua en Costa Rica. *Ambientales-Escuela de Ciencias Ambientales*, 45, 124. Recuperado de <http://www.ambientico.una.ac.cr/pdfs/ambientales/45.pdf>

Villalobos, F., Mateos, L., Orgaz, F., y Fereres, E. (2009). *Fitotécnica: Bases y tecnologías de la producción agrícola* (2nd ed.). Madrid: Mundi-Prensa. Recuperado de <https://books.google.co.cr>

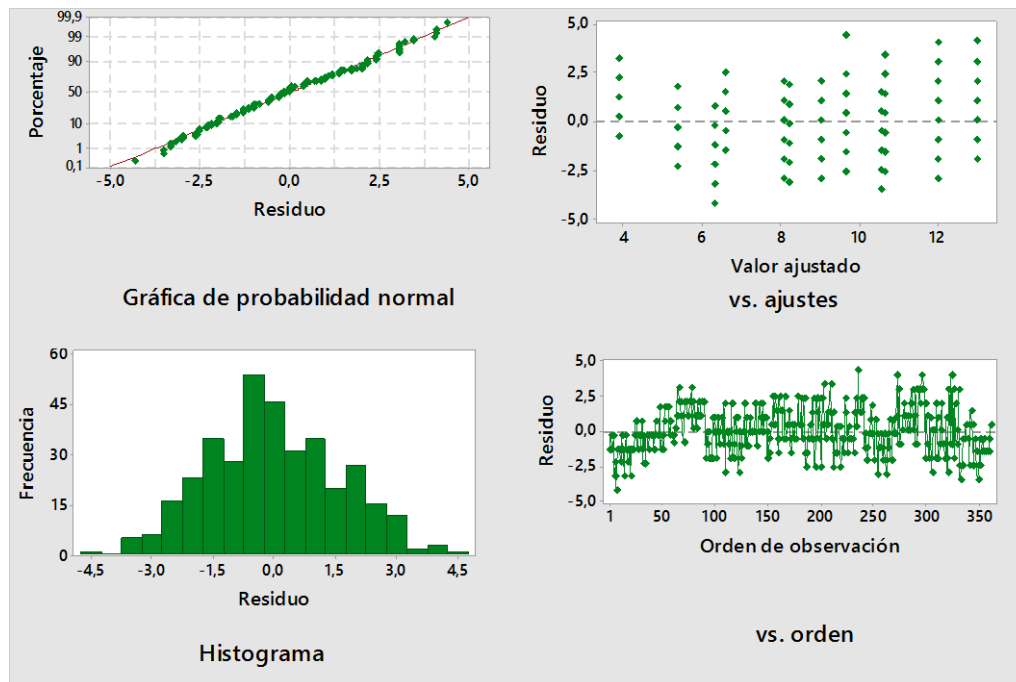
- Villarreal, F. (2002). *Aislamiento y Caracterización de Lactobacillus intestinales con potencial probiótico*. Universidad Nacional de Litoral. Recuperado de <http://bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8080/tesis/bitstream/handle/11185/399/tesis.pdf?sequence=3&isAllowed=y>
- World Health Organization. (1989). *Guidelines for the safe use of wastewater and excreta in agriculture and aquaculture: Measures for public health protection*. Recuperado de [https://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/wastewater/wastreusexecsum.pdf?ua=1](https://www.who.int/water_sanitation_health/wastewater/wastreusexecsum.pdf?ua=1)
- World Health Organization. (2018). Sanitation. Retrieved September 8, 2018, from <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/sanitation>
- Yemaneh, A., Bulbo, M., Schmale, C., y Otterpohl, R. (2014). Investigation of Low-Cost Sugar Supplement for Lactic Acid Fermentation in Terra Preta Sanitation System. Recuperado de <http://www.terra-preta-sanitation.net>
- Zagal, E., y Sadzawka, A. (2007). *Protocolo de métodos de análisis para suelos y lodos*. Universidad de Concepción. Recuperado de [http://www.sag.cl/sites/default/files/METODOS\\_LODOS\\_SUELOS.pdf](http://www.sag.cl/sites/default/files/METODOS_LODOS_SUELOS.pdf)

## Apéndice 1



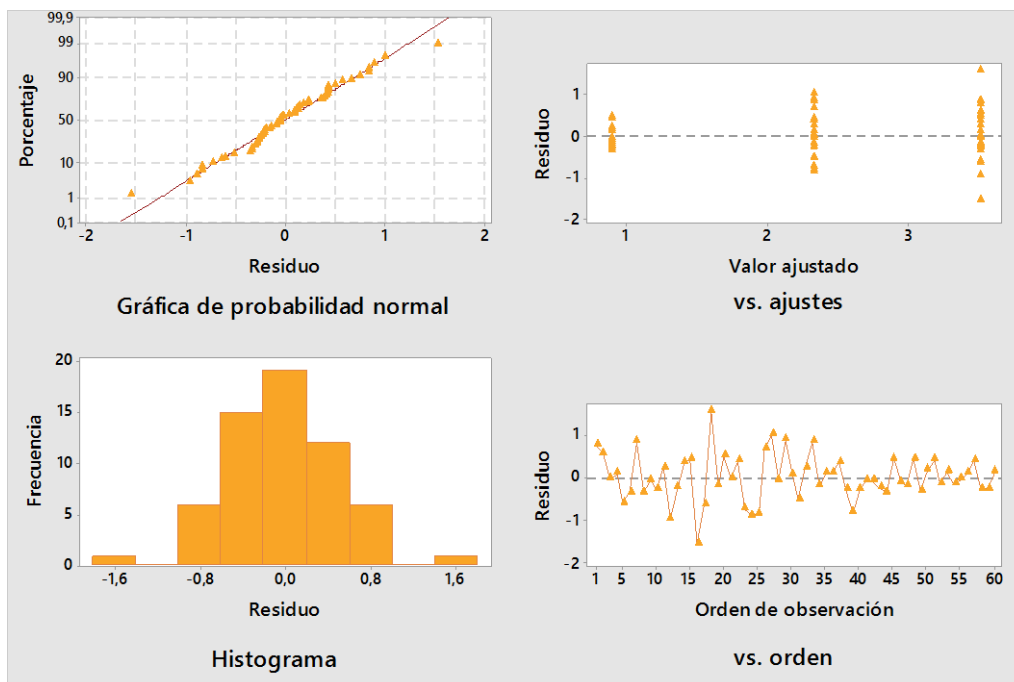
Gráficas de residuos para el longitud de hoja con un 95% de confianza.

## Apéndice 2



Gráficas de residuos para el número de hojas con un 95% de confianza.

### Apéndice 3



Gráfica de residuos para el peso seco verdadero al 95% de confianza.